



TITLE:

光合成細菌Rhodospirillum
rubrumのD-2-ヒドロキシグルタル
酸脱水素酵素に関する研究(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

戎野, 棟一

CITATION:

戎野, 棟一. 光合成細菌Rhodospirillum rubrumのD-2-ヒドロキシグルタル酸脱水素酵素に関する研究. 京都大学, 1976, 理学博士

ISSUE DATE:

1976-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k1694>

RIGHT:

| |
|------|
| 理 |
| 22/函 |
| 1-2 |

学位申請論文

戎野棟一

光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* の D-2-ヒドロキシ
スルタル酸脱水素酵素に関する研究

戎野 棟一

光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* の D-2-ヒドロキシ クルタル酸脱水素酵素に関する研究

目 次

| | |
|---|----|
| 1. 序 | 1 |
| 1-1 光合成細菌における代謝と酸化還元反応 | 1 |
| 1-1-1 生体における酸化還元反応の意義 | 1 |
| 1-1-2 光合成細菌における酸化還元反応と有機酸代謝について | 3 |
| 1-1-3 <i>R. rubrum</i> におけるクルタミン酸生合成に関する研究 | 6 |
| 1-1-4 <i>R. rubrum</i> における 2-ヒドロキシクルタル酸代謝と 酢酸代謝について | 13 |
| 1-2 ヒドロキシ酸脱水素酵素についてのこれまでの研究 | 18 |
| 1-2-1 2-ヒドロキシ酸脱水素酵素について | 19 |
| 1-2-2 2-ヒドロキシクルタル酸脱水素酵素について | 24 |
| 1-3 本研究の目的 | 28 |
| 2. 材料および方法 | 31 |
| 2-1 菌の培養 | 31 |
| 2-2 部分精製酵素の調製 | 33 |

| | |
|----------------|----|
| 2-3 酵素活性の測定法 | 35 |
| 2-4 酵素の蛋白質量の定量 | 37 |
| 2-5 試薬 | 37 |
| | |
| 3 結 果 | 40 |
| 3-1 酵素の部分精製 | 40 |
| 3-2 部分精製酵素の安定性 | 47 |
| 3-3 酵素反応の化学量論性 | 49 |
| 3-4 酵素反応の電子受容体 | 52 |
| 3-5 基質特異性 | 55 |
| 3-6 酵素反応のpH依存性 | 68 |
| 3-7 阻害剤 | 69 |
| 3-8 本酵素のその他の性質 | 75 |
| | |
| 4 考 察 | 78 |
| | |
| 5 謝 辞 | 83 |
| | |
| 6 参 考 文 献 | 84 |
| | |

1. 序

1-1 光合成細菌における代謝と酸化還元反応

1-1-1 生体における酸化還元反応の意義

自然界には、他養的な栄養生活を行なう動物や、光合成による自養的な栄養生活を営む植物、さらに条件の変化に応じて他養的にも自養的にも生存できる光合成細菌などの存在が知られている。また、絶対嫌気条件下で発酵によってエネルギーを獲得して生長する偏性嫌気性菌、また、嫌・好気いずれの条件下でも生長できる通性嫌気性菌、また、好氣的に基質を酸化してエネルギーを獲得する好氣的生物など、多種多様な生物が見い出されている。しかし、一見多様に見える生物全体を通じていいうることは、全ての生物が生体構成物質の合成とエネルギーの獲得を、生存の必須の要件としてしていることである。他養性の生物においては、生体外から取り入れた基質を順次酸化もしくは分解してゆき、その過程で放出されるエネルギーを利用する。一方、自

養性の生物におけるエネルギー獲得系は、光化学的に作動する水素移動機構であり、両者を通じて、水素移動機構が、エネルギー産生機構の本質であるということができる。

近年、生物の進化の過程は、嫌気的条件下(地球上に、生命が初めて誕生した頃、地球は嫌气的・還元的状態であったと考えられている。)において、生体が還元的物質をどのように処理し、また、基質からより多くのエネルギーをどのようにしてひき出すのかという工夫・適応の過程であると考えられるようになってきた(1)。余った還元力をどのように処理し、生体全体の酸化還元の均衡をどのようにして保つかは、生体において、極めて重要な意味をもっている。特に、嫌气的な条件下では、還元力を処理するために、分子状水素として菌体外へ放出する例も、種々の微生物において見い出されている(2)。また、*Glyphag succinicans* における二酸化炭素に依存したグルコースの発酵(3)や、アミノ酸のStickland反応(4)

など、生体が酸化還元の均衡を保つために種々の機能を発展させていることも知られている。また、グルコースによるカタボライト・リフレッシュの作用の発現が、嫌気条件下と好気条件下とで異なるという報文(5)や、NADHを通じての代謝調節(6)、バクテリオクロロフィルの生合成に、酸化還元の均衡が調節的役割を果たしているという報文(7)などがあり、近年、酸化還元の均衡が、生体における代謝調節に果たしている重要な役割について、ますます明らかにされつつある状況である。

1-1-2 光合成細菌における酸化還元反応と有機酸の代謝について

筆者が、研究材料として用いた *Rhodospirillum rubrum* (以下、*R. rubrum* と略記する) は、紅色非硫黄細菌に属し、暗好気条件下においても、また、光嫌気条件下においても生長でき、かつ、環境適応性の強い興味深い微生物である。紅色非硫黄細菌は、トリカルボン酸回路(

以下 TCA 回路と略記する。)の反応を阻害する全ての酵素を有しており、暗好気条件下では、TCA 回路を経て、炭素化合物の末端酸化を行ない、エネルギーを獲得している(8)。一方、光嫌気条件下においては、バクテリオクロロフィルを生合成し、クロマトフォアと呼ばれる含色素顆粒を細胞膜から分化させ(9)、このクロマトフォア内で光のエネルギーを利用して光合成を行ない、エネルギーを獲得している(10)。

光合成細菌における光合成反応は、高等植物における光合成反応と共通な部分も多く存在するが、決定的に異っている点も存在する。その一つは、高等植物の光合成反応では、いわゆる Hill 反応が認められ、酸素の発生が見られるが、光合成細菌の光合成反応ではこの現象は見られない。次に、細菌の光合成反応には、硫化水素、水素あるいは有機酸などのような、Gest (11) が「accessory hydrogen donor」と呼ぶところの水素供与体が必要であること

である。本研究において用いた *R. rubrum* などの
 紅色非硫黄細菌では、有機酸が水素供与体と
 してよく利用される。したがって、*R. rubrum* に
 おいては、光合成反応と有機酸の代謝とは
 密接に関連している。前述した事実から、暗
 好気条件下における TCA 回路を通じての有機
 酸代謝と、光嫌気条件下における有機酸代謝
 とでは、代謝経路が異なっていることが推測
 され、光や酸素分圧が、好氣的代謝経路と嫌
 氣的代謝経路との切り替えスイッチになっ
 ていることは容易に想像される。しかし、こ
 れまで光や酸素分圧が調節的役割を果して
 いる酵素系については、リブローズ 5-リン酸キ
 ナーゼ(12)、7-エニルアラニンアンモニアリアー
 ゼ[EC 4.3.1.5](13)、5-アミノレブリン酸合成酵
 素[EC 2.3.1.37]など数例が報告されているのみ
 である。5-アミノレブリン酸合成酵素につ
 いては、Kutashima ら(14)によって、 H_2 に
 よるフィードバック阻害を受けることの他
 に、酵素量が酸素分圧によって調節され、
 酸素分圧が低いと誘導さ

れることなど(15)、詳細に研究されている。しかし、光や酸素分圧による酵素量や酵素活性の調節については、最近注目されてきているが、まだ不明な点が多い。

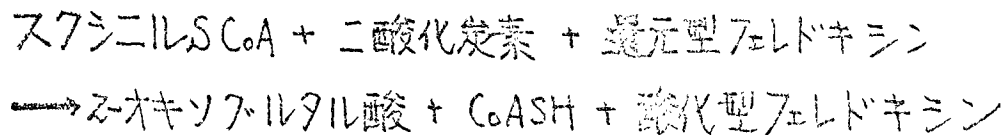
1-13 R. rubrumにおけるグルタミン酸生合成に関する研究

筆者らの研究室では、これまで、R. rubrumのグルタミン酸生合成経路が、暗好気条件下と光嫌気条件下とでは異なるという知見に基づき、生長条件の変化に伴う生合成経路の切り替えの機構を明らかにすることを目的として、研究が進められてきた(16-17)。暗好気条件下における有機酸などの代謝については、すでに、ElsdenとOrmerod(18)がTCA回路に全面的に依存していることを明らかにしているので、研究の焦点は、光嫌気条件下におけるグルタミン酸の生合成経路の解明に絞られた。

光嫌気条件下におけるグルタミン酸の生合成経路に関して、Cutinelliら(19)は、酢酸培地で

生長させた菌体を用いた実験によって、また
 Benedictと Rinne (20) は、リンゴ酸培地で生長さ
 せた菌の無細胞抽出液を用いた実験によって
 、光嫌気条件下においても、TCA回路の反応
 を触媒する酵素群によって有機酸が代謝され
 、同時にグルタミン酸などのアミノ酸も供給
 されること示した。しかし、Hoare (21) は、リン
 ゴ酸培地で生長させた菌体を用いて、 $1\text{-}^{14}\text{C}$ であ
 るいは $2\text{-}^{14}\text{C}$ -酢酸および ^{14}C -炭酸水素ナトリウム
 からグルタミン酸への放射活性の取り込みの
 速度論的解析、ならびに、生成したグルタミ
 ン酸の標識様式の解析を行なった結果から、
 グルタミン酸が、通常のTCA回路の反応を触
 媒する酵素系によって代謝・生成されている
 のではないと主張した。Elsdenと Ormerod (18) は、
 光嫌気条件下に生長させた *R. rubrum* における有
 機酸の代謝経路を明らかにするために、アコ
 ニターゼ [EC 4.2.1.3] の阻害剤であるモノフルオ
 ロ酢酸を用いた実験を行ない、コハク酸、フ
 マル酸、リンゴ酸の代謝については、モノフ

ルオロ酢酸がほとんど阻害効果を示さないことを報告している。さらに、Kikuchiら(22)は *R. rubrum* と同じ紅色非硫黄細菌に属する *Rhodopseudomonas spheroides* (以下 *Rhp. spheroides* と略記する) を用いた実験から、光嫌気条件下では、おおむね、TCA回路の酵素系の活性は抑制されること、また、酢酸、ピルビン酸あるいはオキサロ酢酸以外のジカルボン酸は、TCA回路の酵素系によらずに代謝されることを報告している。Shigesadaら(23)は、上記の知見と、標識したコハク酸から生成したグルタミン酸の標識様式の実験結果とを総合して、次のような代謝経路の存在する可能性を示唆した。

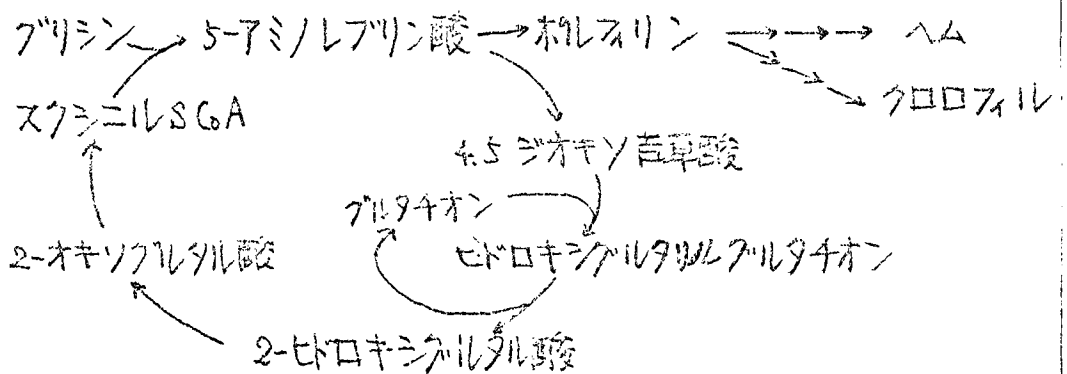


フェルドキシンの関与した還元的炭酸固定反応は、Buchananら(24-25)によって、最初 *Caldobium thiosulfatophilum* において見い出され、後には、*R. rubrum* においても存在することが明らかにさ

れた。しかし、この反応のグルタミン酸生合成に対する寄与については、彼らが採用した嫌気条件が水素95%、二酸化炭素5%という特殊な条件であることから、通常の嫌気条件下において、この経路が実際に働いているのか否かについて明らかでなく、今後検討する必要があると思われる。以上の点と関連して、最近、Shigesada(26)は、光嫌気条件下における*R. rubrum*のグルタミン酸生合成経路として、上述の経路以外に、次に記すような代謝経路が存在していることを明らかにした。彼は、1,4-セコハク酸から生成したグルタミン酸の標識様式が、下記 of 代謝経路を想定することによって説明できること、 $2\text{-}^{14}\text{C}$ -グリシンから $1\text{-}^{14}\text{C}$ -グルタミン酸への放射活性の取り込み量がコハク酸を添加することによって増加すること、また、 5- アミノレブリン酸、あるいは、 $4,5$ -ジオキソ吉草酸の放射活性が、グルタミン酸に取り込まれること、および、このグルタミン酸への放射活性の取り込み量が標識して

いない 2-ヒドロキシグルタル酸を添加することによって減少する。いわゆる希釈効果を受けることなどの事実を明らかにし、オ1図に示したコハク酸-グリシン回路の存在を明らかにした。

オ1図 コハク酸-グリシン回路

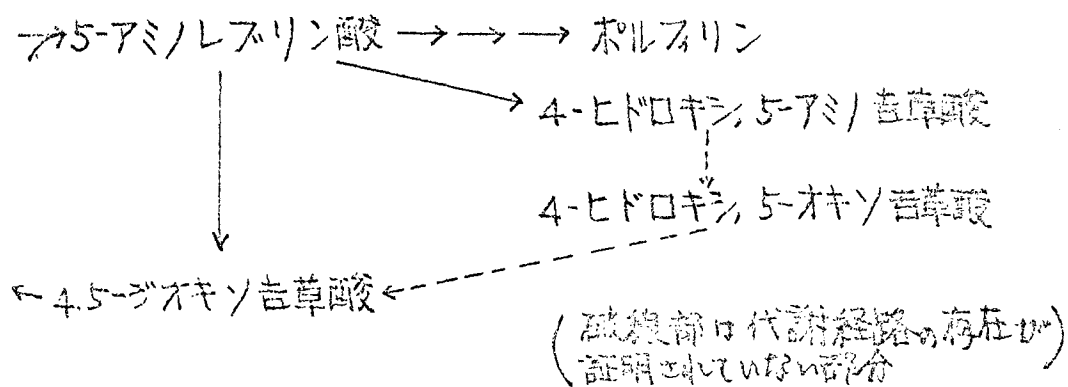


上記の回路は、1953年に、SheminとRussell(27)が、動物において、その存在の可能性を指摘している。彼らは、鳩に 5-¹⁴C-5-アミノレブリン酸、あるいは、5-¹⁴C-4-オキソグルタルアルデヒドを与え、尿水中に排出される尿酸に取り込まれた放射活性の標識様式を解析した結果、および、ねずみの腹腔内に 2-¹⁴C-グリシンなどを注射し、尿中に排出される標識化合物を

分析した結果などから、5-アミノレブリン酸の5位の炭素、即ち、グリシンの2位の炭素が炭素数一つの化合物（蟻酸など）の合成に用いられていること、および、循環的なコハク酸-グリシン回路の存在する可能性を指摘した。しかし、彼らは、回路を構成する中間代謝物について、詳しく検討しておらず、また、反応を触媒する酵素については、全く追究を行なっていない。それ以来、この回路の重要な中間代謝物である5-アミノレブリン酸に関しては、1-1-2項で述べたように、ホルフィン生合成系の調節という観点から、その合成酵素の酵素量および活性面の調節などが研究(24-29)されてきたに留まり、最近までこの回路は、ほとんどかえりみられることがなかった。

最近、Shigesadaらは、リンゴ酸培地で光嫌氣的に培養した *R. rubrum* の菌体を用いて、5-アミノレブリン酸が極めて速やかに代謝され、未知の中間代謝物が蓄積することを見い出し

た。この中間代謝物は Dowex-2 によるイオン交換クロマトグラフィーにおいては、5-アミノレズリン酸と同一の中性アミノ酸画分に検出された。しかしながら Malzerhall と Granick の方法(30)に従って、アセチルアセトンと Ehrlich 試薬による呈色反応を行なったが、陰性であり、5-アミノレズリン酸とは異なることが明らかになった。Shigesada らは、戸紙電気泳動法などいくつかの方法を用いて、この中間代謝物が 4-ヒドロキシ、5-アミノ吉草酸であると同定した(31)。Shigesada らが新たに同定した 4-ヒドロキシ、5-アミノ吉草酸を含めた次の代謝経路の存在が想定されるが、部分的には、まだ証明されていない箇所もある。



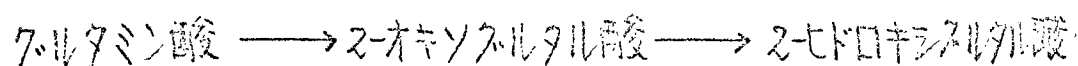
前述したように、5+アミノレブリン酸がホルズリン合成系以外の経路によっても代謝されることが明らかになるにつれて、この回路が5+アミノレブリン酸を、ホルズリン合成経路の反応と奪い合うことによって、ホルズリン合成系に対して、何らかの調節的役割を果たしているのではないかという興味も、もたれるところである。

コハク酸-グリシン回路の反応を触媒する酵素群の中で、2+オキソスルタル酸脱水素酵素(32)は、5+アミノレブリン酸合成酵素と同様、詳細に研究されている。アラニンなどいくつかのアミノ酸から、4,5ジオキソ吉草酸へ、アミノ基の転移反応を触媒する酵素については、NeubergerとTurner(33)によって見い出され、部分精製されて、基質特異性や触媒反応におけるスルフヒドリル基の関与などについて、若干の報告がなされているにすぎない。コハク酸-グリシン回路の反応を触媒する他の酵素については、現在までのところ、ほとんど研

究がなされていがないのが実情である。

1-4 *R. rubrum* における α -ヒドロキシグルタル酸代謝と酢酸代謝について

前項で、Shigesada が、光嫌気条件下に培養した *R. rubrum* における グルタミン酸生合成経路に関して α -ヒドロキシグルタル酸を経由する経路の存在を明らかにしたことを記したが、この事実を間接的に支持するいくつかの知見が報告されている。Johnson と Westlake (34) は、*Peptococcus aerogenes* の無細胞抽出液を用いた実験において、 ^{14}C で標識した グルタミン酸の放射活性が α -ヒドロキシグルタル酸に取り込まれることを見い出した。彼らは、



の代謝経路を想定している。Lelud と Whiteley (35) は、*Micrococcus aerogenes* と *Acidaminococcus* sp. において、上記の代謝経路の存在を明らかにし、これらの菌におけるグルタミン酸発酵は、Clostridium

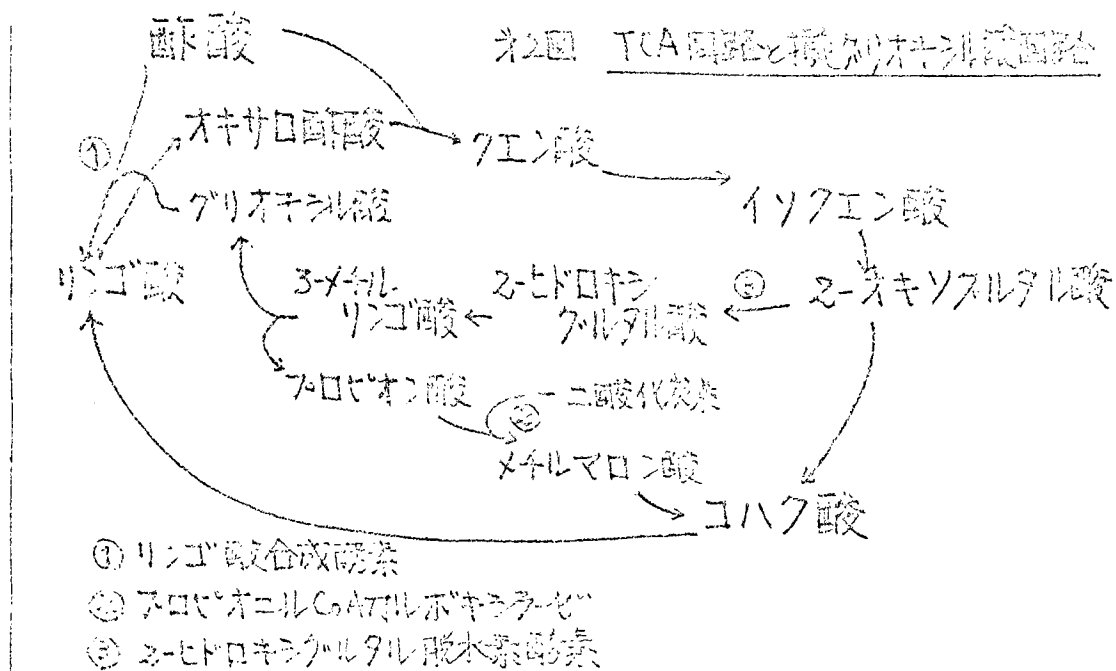
tetramorphum における

グルタミン酸 → 3-メチルアスパラギン酸 → メサコン酸 → 4-ヒドロキシ

の代謝系(36)と異っていることを明らかにした。また、Ohmori(37)は、光嫌氣的にグルタミン酸培地に生長させた *R. rubrum* の無細胞抽出液に、¹⁴Cで標識したグルタミン酸を与えると、放射活性が3-メチルアスパラギン酸やメサコン酸に取り込まれること以外に、2-ヒドロキシグルタル酸にも取り込まれることを報告している。

さらに、2-ヒドロキシグルタル酸の代謝に関して、PorterとMetz(38)は、光嫌氣的に酢酸培地に培養した *R. rubrum* の無細胞抽出液に、2-ヒドロキシグルタル酸を添加すると、グリオキシル酸が生成することを報告した。筆者らはもし、この知見が事実ならば、これまで明らかでなかった *R. rubrum* を酢酸培地に生長させた時の酢酸の代謝経路を解明する手がかりになると考えた。筆者らは、*R. rubrum* には *Escherichia*

coli (以下 *E. coli* と略記する) など知られて
 いるトリオキシル酸回路(39)に類似した次のよ
 うな代謝経路が存在するのではないかと推定
 して、その根拠は次のとおりである。オ一
 に、*R. rubrum* にはトリオキシル酸回路の初段反
 を阻害するイソクエン酸開裂酵素[EC 4.1.3.1]が
 ないとされているが、トリオキシル酸回路の
 他の鍵酵素であるリンゴ酸合成酵素[EC 4.1.3.2]
 (下図の①)は見い出されていることである
 (40)。オ二に、酢酸培地に生長させた *R. rubrum* に
 おいてフロセオニル CoA カルボキシラーゼ[EC
 6.4.1.3]の高い活性が見い出されていること(41)
 。また、リンゴ酸合成酵素およびフロセオニ
 ル CoA カルボキシラーゼの生理的役割がわか
 っていないこと。オ三に、筆者と同じ研究室
 の Nakano ら(42)が、*Bacillus* sp. においてトリオキシル
 酸とフロセオン酸が CoA の存在下に縮合して
 、3-メチルリンゴ酸を生成することを明らかに
 し、また Reeves(43)が、*E. coli* では、縮合生成物
 は2-ヒドロキシスルタル酸であると報告して



いること。オ四に、*R. rubrum* と近縁種である *Rp. sphaeroides* (本菌も *R. rubrum* と同様に、イソクエン酸開裂酵素を持たず、リンゴ酸合成酵素をもつと報告されている(40)) の突然変異株を用いた実験結果から、酢酸が最元的炭酸固定反応によって、ピルビン酸になり、さらにオキサロ酢酸に至る代謝経路が、酢酸代謝において重要な役割を果たしているという知見が報告されていること(44)。オ五に、Porter と Mott の論文によれば、2-ヒドロキシグルタル酸が開裂して、グリオキシル酸が生成したと記載され

ていゝが、もし、このような反応が実在する
とすれば、開裂反応の他の生成物は、 β -ヒドロ
キシ酸と考えられること。などである。

しかし、筆者は、酢酸培地で生長させた *R. rubrum* の無細胞抽出液に、 β -ヒドロキシフルタル酸を添加して、 α -クリオキシル酸が生成するか否かを、Porter と Merril の報文に記載されている限り忠実に条件を守って追試を行ない、また、反応条件を種々変更・修正した実験も試みたが、 α -クリオキシル酸は検出できず、 α -オキソ酸としては、 β -オキソフルタル酸を検出したに過ぎた。彼らの報文は速報であり、詳細な実験条件の記載がないために、追試に成功しなかった可能性も考えられないではないが、彼らが、 α -クリオキシル酸と β -オキソフルタル酸を見誤った可能性もあると推察している。その後、彼らの詳報は報告されていない。 β -ヒドロキシフルタル酸脱水素酵素が、これまで不明であった *R. rubrum* における酢酸代謝に何らかの寄与をしているのではないかと

いう可能性は、少なくなり、 R_2NAD^+ における
 酢酸代謝の経路は、依然として不明のままで
 ある。

ヒドロキシ酸脱水素酵素についてのこれま
 での研究

酸代謝反応は、エネルギー代謝を考える
 上で、極めて重要な意味をもっている。酸代
 謝反応を触媒する酵素についても古くから
 注目を集め、多くの酵素が精製され、基質特
 異性、電子受容体、活性化剤や阻害剤などの酵
 素化学的諸性質、なうびに、生体内で果して
 いる生理的役割について、詳細に研究されて
 いる。ヒドロキシ酸を脱水素して、オキソ酸
 に変える反応を触媒する酵素は、EC 1.1.1.11
 に分類され、これまで、数多く報告されて
 いる。以下に、その概要を記した。

ヒドロキシ酸脱水素酵素について

3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.3] (45) や 4-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.6] (46) などのように、いろいろな位置にヒドロキシル基をもつカルボン酸の脱水素反応を触媒する酵素もいくつか報告されているが、2位の炭素にヒドロキシル基をもつカルボン酸に働く酵素が多い。このうち、L-リンゴ酸酵素 [EC 1.1.1.38] [EC 1.1.1.40] や イソクエン酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.41] [EC 1.1.1.42] などのように、脱水素反応を触媒すると同時に、他の位置にあるカルボキシル基を脱炭酸する反応をも触媒する酵素については、同一生体内に、NAD および NADP を補酵素として要求する二つの酵素が含まれる場合が多く、その生理的役割について、多くの研究がなされている (47-48)。近年、D-リンゴ酸酵素の存在が、E. coli など (49-50) において明らかにされてきているが、酵素化学的には、不明な点が多い。

最も構造が簡単な2-ヒドロキシ酸であるグリコール酸に働く酵素については、動物や高

[EC 1.1.3.1]

等植物などに見い出されており、トリコール酸の他に、L-乳酸やL-2-ヒドロキシカプロン酸にも働くことが知られている。電子受容体としては、2,6-ジクロロフェニールインドフェニール(以下、DCIPと略記する)の他に、酸素分子も有効であること、また、ヨード酢酸をはじめとするスルフヒドリル剤が阻害剤となりうることなどが報告されている(51-52)。

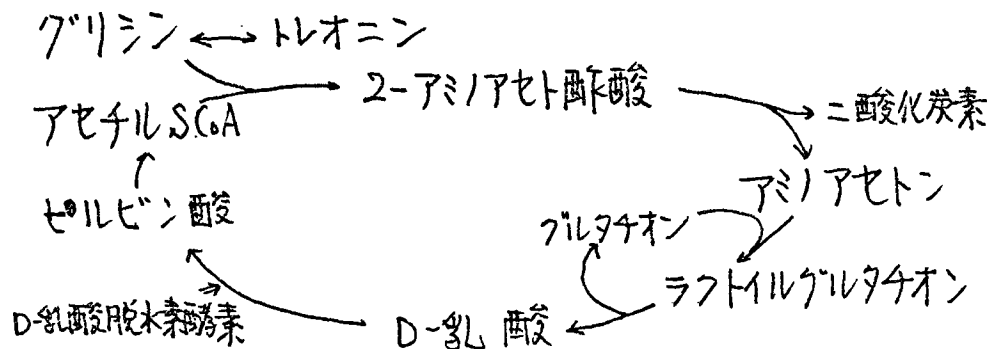
脱炭酸反応を伴わない2-ヒドロキシ酸脱水素酵素の中で、最も詳細に研究されているのは、L-乳酸脱水素酵素[EC 1.1.1.27]である。この酵素は、動植物、微生物を問わず広く分布していて(53)、アイソザイムの存在とその生理的役割について、Kaplan一派(54)の秀れた研究がよく知られている。NADを電子受容体として必要とするL-乳酸脱水素酵素の基質特異性は低く、ピルビン酸以外に、炭素数4-9の2-オキソ酸にも、炭素数5-10の2,4-ジオキソ酸にも作用する(55)。また、ピルビン酸などの生成物による阻害を受けることなどが知られている(56)。

。このほかに、嫌氣的に培養したパン酵母から、電子受容体として、フェリチトクロムCを必要とするL-乳酸脱水素酵素[EC 1.1.2.3]が見い出されている。この酵素は、L-乳酸の他に、グリコーン酸やD-2-ヒドロキシ酪酸に働くが、D,L-3-ヒドロキシ酪酸やD-乳酸には働かない(57)。また、この酵素は、脂肪酸、蔞酸、リンゴ酸などで阻害され、DCIPやチトクロムCなどが、フェリチトクロムCに代りうる(58)。

一方、D-乳酸脱水素酵素[EC 1.1.1.28]については、*Lactobacillus arabinosus*(59)、*E. coli*(60)、粘菌の一種 *Polysphondylium pallidum*(61) などにおいて見い出されている。*E. coli*において見い出された酵素は、NADを電子受容体として要求し、オキサミン酸によって阻害を受け、また、2-オキソ酪酸で賦活化される。酵母においては、種々のチトクロムを電子受容体とするD-乳酸脱水素酵素[EC 1.1.2.4]が見い出されている(62)。この酵素は、D-乳酸の他に、D-2-ヒドロキシ酪酸にも働き、金属キレート剤による阻害を受ける

ことなどが報告されている。この酵素は、コハク酸-グリシン回路と類似のアミノアセトン回路(オ3図)を構成する一反応を触媒する酵素であると考えられている(63)。

オ3図 アミノアセトン回路



リンゴ酸の脱水素反応を触媒する酵素についても、現在までに、L型異性体に特異的に働く酵素の他に、D型異性体に特異的に働く酵素が報告されている。L-リンゴ酸脱水素酵素[EC 1.1.1.37]は、TCA回路を構成する一反応を触媒する酵素として知られ、動植物界を問わず広く分布している(64)。NADを電子受容体とするこの酵素は、L-リンゴ酸の他に、L-酒石酸や2-ヒドロキシグルタル酸にも作用し、L-リンゴ酸を基質とした場合、2-ヒドロキシジ

カルボン酸によって、拮抗的に阻害を受ける。
D-リンゴ酸脱水素酵素は、うにの卵においてその存在が報告されている。この酵素は、NADを電子受容体とせず、そのN-アセチル誘導体を必要とする点に大きな特徴がある(65)。

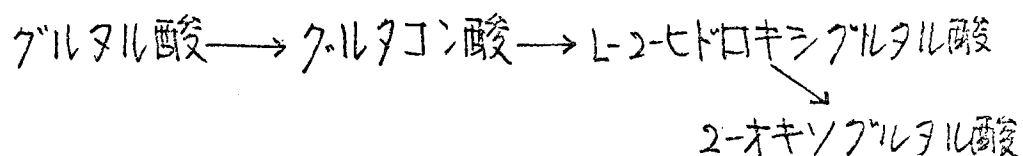
TubbsとGreville (66)によって、基質特異性が比較的低い2-ヒドロキシ酸脱水素酵素[EC 1.1.3.a]が、うさぎの肝臓や腎臓のミトコンドリア画分に見い出された。この酵素は、種々の色素やフェリシアニド、4-トクロムCを電子受容体とする。基質としての活性の大小は、Michaelis定数(K_m)でみる限りでは、メソ酒石酸、D-リンゴ酸、D,L-2-ヒドロキシ酪酸の順になり、また、最大速度(V_m)でみると、D,L-2-ヒドロキシ-n-オクタン酸、D,L-2-ヒドロキシ酪酸の順になると報告されている。彼らは、乳酸およびその構造類縁体である2-ヒドロキシ酸に関して、炭素鎖の長さとは K_m/V_m とが比例関係にあることを報告している。しかし、残念なことに、彼らは2-ヒドロキシジカルボン酸については

検討していない。

122 2-ヒドロキシシクルタル酸脱水素酵素について

2-ヒドロキシシクルタル酸脱水素酵素についても、L型異性体に働く酵素とD型異性体に働く酵素の2種の酵素が知られている。L-2-ヒドロキシシクルタル酸に特異的な脱水素酵素については、古く1937年に、Weil-Mallerbe (67)が、ねずみの心臓、肝臓、腎臓などの器官の切片を用いて、L-2-ヒドロキシシクルタル酸の酸化反応を見たのが最初である。彼は、豚の心臓からこの酵素を部分精製したが、D型異性体には働かず、最終的には酸素に水素を渡す働きをする。基質から酸素に電子を渡す中間電子受容体として、ピオシアニンやフェナジンメトクロリドが、高い活性を有している。チトクロムCなど動物細胞に含まれている物質は、中間電子受容体としての活性をもたない。動物におけるL-2-ヒドロキシシクルタル酸脱

水素酵素について、RothsteinとMiller(68)は、グル
タル酸の代謝経路として



を想定し、放射活性物質をぬすみの腹腔内に
注射するという実験を行なった結果から、こ
の酵素が存在することを報告している。彼ら
は、6-¹⁴C-リジンの放射活性が、グルタル酸に
取り込まれるという知見と合わせて、上記の
代謝経路が、リジンの代謝に関連した経路で
あると考えている。

微生物においては、BeppuとArima(69)が、アロ
イソクエン酸培地に生長させた *Achromobacter* sp.
に、NAD要求性のL-2-ヒドロキシグルタル酸
の脱水素反応を触媒する酵素を見い出した。

また、Okuyamaら(70)は、光嫌気条件下に、リン
ゴ酸およびスルタミン酸培地に生長させた
Rhodopseudomonas spheroides において、同様のNAD要
求性のL-2-ヒドロキシグルタル酸脱水素酵素

を見い出している。これらの他に、Lerud と Whiteley (36) は、*Micrococcus aerogenes* において NAD に依存した 2-オキシスルタル酸の還元活性を見出し、反応生成物が 2-ヒドロキシスルタル酸であることを、ペーパークロマトグラフィーを用いて同定している。この酵素の 2-ヒドロキシスルタル酸を脱水素する方向への活性は、2-オキシスルタル酸を還元する方向への活性に比べて小さいことが報告されている。彼らは、*Acidaminococcus* sp. にも同様の活性を認めている。

D-2-ヒドロキシスルタル酸脱水素酵素については、Reitz と Rodwell (71) が *Pseudomonas putida* において、リジンの分解代謝に関与する誘導酵素として報告しているのみである。この酵素は、リジン培地に生長させた菌体の無細胞抽出液において最も活性が高く、スルタル酸培地、スルコース培地、スルタミン酸培地の順で活性が低下し、フロピオン酸や吉草酸培地で生長させた菌体の無細胞抽出液においては

、活性は認められなかった。彼らは、グルコース培地で生長させた菌体の無細胞抽出液において認められた活性は、D-リンゴ酸脱水素酵素によるものであろうと考えた。D-2-ヒドロキシスクルタル酸脱水素酵素は、Pseudomonasの電子伝達系と関連をもち、電子受容体としては、酸素、DCIP、および、チトクロムCが有効であり、生体内では、フラビンか非ヘム鉄が直接の電子受容体であるうと推定されている。

Shigesadaは、D-2-ヒドロキシスクルタル酸脱水素酵素を、光嫌気条件下にリンゴ酸培地に生長させたR. rubrumの無細胞抽出液の中に見い出し、この酵素を、1-1-3項で述べにように、コハク酸-スリシン回路を構成する反応を触媒する酵素と考えた。

1-3 本研究の目的

これまで、光合成細菌における代謝の研究

の意義、特に酸化還元反応の意義について、簡単に記してきたが、光合成細菌における有機酸の代謝、とりわけ、光嫌気条件下における代謝については不明な点が多い。また、これらの代謝に関与する酵素についても、明らかにされていない点が多い。

筆者は、筆者らの研究室における光嫌気条件下におけるグルタミン酸生合成についての研究の成果をうけつぎ、Shigesadaが明らかにしたコハク酸-グリシン回路を構成する反応を触媒する酵素の一つ一つの性質を明らかにすることを目的として研究を行なった。このことによって、コハク酸-グリシン回路の存在を確立し、同時に、グルタミン酸生合成やホモセリン生合成系の調節に対する寄与を明らかにする一助とすることを目的とした。筆者は、D-2-ヒドロキシフルタル酸脱水素酵素の部分精製を行ない、本酵素の諸性質を検討した。これに関連して、4-ジオキソ吉草酸を、D-2-ヒドロキシフルタル酸へ導く反応を触

媒する酵素(アミノアセトン回路におけるグリ
 リオキガラーゼに相当する)については、当
 [EC 3.1.3.7][EC 4.4.1.5]
 研究室の小山の研究(72)がある。また、酵素代
 学的にみても、D-2-ヒドロキシシスタル酸脱
 水素酵素は、1-2-2項に記したように、*Pseudomonas*
*putida*において、リジンの分解代謝に関与する
 誘導酵素として、報告されているのみであり
 、本酵素と、1-2-1項にこれまでの研究の概要
 を記した種々の2-ヒドロキシ酸脱水素酵素と
 の異同を明らかにすることは、興味深い問題
 である。

筆者は、2-ヒドロキシ酸脱水素酵素、とり
 わけ、2-ヒドロキシシスタル酸脱水素酵素の
 これまでに明らかにされた諸性質と対比させ
 なから、

・電子受容体 ・基質特異性 ・阻害剤と金
 属要求性

の点を中心に、*R. rubrum*におけるD-2-ヒドロキ
 シスタル酸脱水素酵素の性質を、部分精製
 標品を用いて明らかにしたので報告する。

2 材料および方法

2-1 菌の培養

本研究に用いた菌株は、大阪大学・蛋白質研究所、堀尾博士より頂いた *R. rubrum* である。菌の培養に用いたリンゴ酸培地の組成は、表1に示すとおりである(73)。リジン培地の場合は、D,L-リンゴ酸の代りに L-リジン 3.0g を用い

表1 リンゴ酸培地の組成 (1ℓあたり)

| | | |
|-------------------|--------|----------------------|
| 硫酸アンモニウム | 1.25g | 微量元素溶液 1ml |
| D,L-リンゴ酸 | 6.0g | 溶液 100 ml |
| リン酸-水素カリウム | 900mg | 木ウ酸 280mg |
| リン酸ニ水素カリウム | 600mg | 硫酸マンガン・4水塩 210mg |
| 硫酸マグネシウム・7水塩 | 200mg | モルブデン酸ナトリウム・2水塩 75mg |
| 塩化カルシウム・2水塩 | 75mg | 硫酸亜鉛・7水塩 24mg |
| 硫酸ネー鉄・7水塩 | 11.8mg | 硝酸ネー銅・3水塩 4mg |
| エチレンジアミン四酢酸(EDTA) | 20mg | |
| ビオチン | 15γ | |

水酸化ナトリウムで pH は 6.8 に調整し、水道水で 1ℓ にする。

酢酸培地の場合には、酢酸 3.0g を用い、水酸化ナトリウム溶液で、前者は pH 6.8 に、後者は 6.6 に調整した後、加圧滅菌した。後者の場

合 上記の液とは別に加圧滅菌した1M炭酸水素ナトリウム溶液を20 ml加えたものを培地とした。その培地の最終pHは6.8である。

菌の保存には、2%肉エキス-ペプトン寒天培地〔1 lあたり 肉エキス10 g、ペプトン10 g (ともに栄研化学株式会社製)、リン酸二水素カリウム6.4 g、リン酸一水素ナトリウム3.8 g、寒天20 gを含む〕を用いた。

菌の培養には、50 ml容三角フラスコを用い、培養液を分注し、これに菌を接種した後、半嫌気条件下に、250 Wのタンクステンランフを用いて光照射を行ない、28℃で2日間培養した。この前培養を、全て1.5 l容のRollx氏の培養フラスコに移し、光照射条件下に、半嫌気状態で、リンゴ酸培地の場合は2日間培養、リジン培地、および酢酸培地の場合は3日間培養した。菌体収量(湿重量)は1.5 lあたり、リンゴ酸培地で約6 g、リジン培地で約5 g、酢酸培地で約3.5 gであった。

2-2 部分精製酵素の調整

生長した菌体は、冷却遠心分離機（久保田製作所製）KR-6Pを用い、 $8400 \times g$ 、10分間の遠心分離により集菌した。集菌した菌体は、 $0.1M$ リン酸カリウム緩衝液（ $pH 7.0$ ）に懸濁し、 $10000 \times g$ 、10分間の遠心分離操作を2度行なって洗浄した。菌体（湿重量）の2倍量の $0.1M$ リン酸カリウム緩衝液に懸濁し、ソニケーター（大岳製作所製）を用い、20キロヘルツで10分間、音波破碎した。 $10000 \times g$ で15分間遠心分離して細胞残渣などを除き、得られた上清を、さらに日立分離用超遠心機40P型、あるいは65P型を用いて、 $105000 \times g$ で60分間超遠心分離を行ない、上清（ $105000 \times g$ 上清と称する）を得た。 $105000 \times g$ 上清に、最終濃度が35%飽和になるように硫酸アンモニウム（硫安と以後略記する）を加え、30～60分間攪拌後、 $10000 \times g$ で15分間の遠心分離を行ない、沈澱画分を得た。この沈澱画分を、 $0.1M$ リン酸カリウム緩衝液（ $pH 7.0$ ）に懸濁し、コール酸ナトリウムを最

終濃度が0.5%になるように加え、15～20分間攪拌した。硫酸の飽和溶液を加え、15～35%飽和画分を沈澱させた。この沈澱画分を0.001Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)に溶かし、リン酸カルシウムゲルを酵素蛋白質量の約4倍の重量加えて、酵素蛋白質を吸着させた。ゲルから酵素蛋白質を溶出する際には、0.5Mリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)を用いた。

菌体11.2gから得た105000×g上清からの部分精製の一例を表2に示す。およそ17倍に精製され、活性の回収率は41%であった。これらの酵素の精製操作は全て0～4℃で行なった。

通常の実験では、コール酸ナトリウム処理

表2 D-2-ヒドロキシルタル酸脱水素酵素の部分精製 後の硫酸15

| 酵素標品 | 総蛋白量 mg | 総活性 単位 | 比活性 単位/mg蛋白 | 精製度 倍 | 回収率 % | ～35%飽和 沈澱画分を 0.1Mリン 酸カリウム 緩衝液(pH 7.0)に溶かす |
|---------------------------|------------|-----------|----------------|----------|----------|--|
| 105000×g上清 | 606 | 4.32 | 7.1 | 1 | 100 | |
| 硫酸画分 | 50.2 | 3.41 | 67.9 | 9.2 | 79 | |
| コール酸ナトリウム 15-35%飽和沈澱画分 | 25.2 | 2.29 | 90.8 | 12.8 | 53 | |
| リン酸カルシウムゲル処理 | 14.5 | 1.78 | 122.7 | 17.3 | 41 | |

は、 0.1 M トリス+塩酸緩衝液 ($\text{pH } 7.5$) に溶かしたものを部分精製酵素標品として、本酵素の諸性質の検討に用いた。各精製操作において、酵素蛋白質の精製度に、ある程度のバラツキがあり、コール酸ナトリウム処理後の硫酸 $15 \sim 35\%$ 飽和沈殿画分の部分精製酵素の比活性は、 $45 \times 10^3 \sim 140 \times 10^3$ 単位 / mg 蛋白であった。酵素の部分精製の詳細は、結果の3-1項で述べる。

2-3 酵素活性の測定法

酵素活性の測定には、基本的には表3に示す組成の反応混液を用いた。電子受容体として、合成色素であるDCIPを用い、色素、緩衝液、酵素液を混

表3 反応混液の組成

和し、 30°C で5分間放置後、基質であるD-2-ヒドロキシグルタル酸を、添加攪

| | |
|--------------------------------|--------------------|
| D-2-ヒドロキシグルタル酸 | $3\mu\text{mol}$ |
| DCIP | $0.3\mu\text{mol}$ |
| トリス*塩酸緩衝液 ($\text{pH } 7.5$) | $270\mu\text{mol}$ |
| 酵素液 | 0.1 ml |

総容量 3.0 ml *トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン

拌することによって、反応を開始させた。部分精製酵素標品を活性測定に用いた場合、活性の大きさと蛋白質量との間には、蛋白質量 $240 \mu\text{g}$ まで比例関係が認められた。

酵素標品として、 $105,000 \times \text{g}$ 上清を用いる際には、粗酵素液による DCIP の再酸化を防ぐために、 1 mM のシアニ化カリウムを反応混液に添加して用いた。

30°C において、 600 nm における色素の還元による吸光度の減少を、日立分光光度計 (124 型) で測定した。還元された DCIP 量は、 600 nm における色素の酸化型に対する還元型の差分分子吸光係数 $1.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いて、計算によって求めた。DCIP のかわりに、チトクロム C あるいは C_2 を電子受容体として用いた際には、 550 nm における吸光度の増加を測定し、DCIP の場合と同様に、チトクロム C あるいは C_2 の還元型の量を、酸化型に対する還元型の差分分子吸光係数 $2.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いて、計算によって求めた。各電子受容体を、1 分間に $1 \mu\text{mol}$

還元する酵素活性を1単位とした。

2-4 酵素の蛋白量の定量

酵素の蛋白量は、蒸留水に懸濁したセファデックス G-25 カラムを通して、酵素標品の脱塩を行なった後、Lowry らの方法(74)に従って定量した。標準試料としては、牛の血清アルブミンを用いた。

2-5 試薬

L-2-ヒドロキシグルタル酸は、英国の Koch-Light 社より購入した。D-2-ヒドロキシグルタル酸は、協和発酵工業株式会社製の D-グルタミン酸を、Fisher と Moreschi の方法(75)に従って、37.5% 硫酸に溶解し、亜硝酸ナトリウムと反応させた後、炭酸亜鉛を加え、D-2-ヒドロキシグルタル酸の亜鉛塩として調製した。D-グルタミン酸 10 g から、収量 4.74 g が得られ、収率は 39% であった。使用に際して、D-2-ヒドロキシグルタル酸の亜鉛塩を、少量の Dowex-50

(H^+ 型) を含む蒸留水に溶かし、亜鉛イオンをDowex-50 (H^+ 型) に吸着させた後、蒸留水でD-2-ヒドロキシスルタル酸を溶出した。得られたD-2-ヒドロキシスルタル酸は、ペーパークロマトグラフィーにおいて単一のスポットを示し、また、 R_f 値も、文献値および対照として用いたL-2-ヒドロキシスルタル酸の R_f 値とよく一致した。また、水溶液からD-2-ヒドロキシスルタル酸をエーテルで抽出し、エーテル溶液を無水硫酸ナトリウムカラムで脱水した。エーテル溶液に、ジアゾメタンを加えて酸をメチルエステルに変え、ガスクロマトグラフィーを行なった(76)。クロマトグラムは単一のピークを示し、L-2-ヒドロキシスルタル酸のメチルエステルの保持時間とほぼ一致した。酵素反応の基質として用いる場合は、既知の濃度の水酸化ナトリウム溶液で滴定して濃度を決定し、ナトリウム塩として用いた。

D-およびL-2-ヒドロキシスルタル酸のナトリウム塩溶液に、他方の光学異性体などの程

度含まれているかを検討するため、旋光度を Applied Electric Lab. Ltd. の MP-11 型旋光度計で測定した結果、D-2-ヒドロキシフルタル酸試料には、およそ 10% の L 型基質が、L-2-ヒドロキシフルタル酸試料には、およそ 5% の D 型基質が混入していることがわかった。各試料とも、Dowex-50 (H⁺型) のカラムを通した後、水酸化ナトリウム溶液で滴定して濃度を決定した後、希薄な溶液なので、精度のよい結果は得られなかった。

R. rubrum のチトクロム C₂ は、大阪大学・蛋白質研究所の堀尾博士より頂いたものを用いた。

セファテックス G-25 は、Pharmacia Fine Chem. 社より購入した。その他の薬品は、培養に用いたものを除いて、全て特級試薬であり、半井化学薬品より購入した。

3. 結 果

3-1 酵素の部分精製

リンゴ酸培地で光嫌気条件下に培養した菌体約11gを音波破碎した後、 $10,000 \times g$ で15分間遠心分離して細胞残渣を除いた無細胞抽出液は、さらに $50,000 \times g$ で1時間超遠心分離し、沈澱と上清とに分けた。上清は、さらに $80,000 \times g$ で1時間超遠心分離し、その上清はもう一度 $105,000 \times g$ で1時間超遠心分離し、各画分に含まれるD-2-ヒドロキシグルタル酸脱水素活性を測定した。その結果を表4に示す。

D-2-ヒドロキシグルタル酸脱水素活性は、どの画分にも見い出されたが、 $105,000 \times g$ 上清画分に、総活性の約40%が見い出された。

表4 D-2ヒドロキシグルタル酸の脱水素活性の分布

| 画 分 | 総活性 (単位) | 百分率 % |
|---|-------------|----------|
| 無細胞抽出液を $105,000 \times g$ で1時間超遠心分離し、沈 | | |
| 50,000xg 沈澱画分 | 1.73 | 14.7 |
| 50,000-80,000xg 沈澱画分 | 2.37 | 20.1 |
| 80,000-105,000xg 沈澱画分 | 2.86 | 24.3 |
| 105,000xg 上清画分 | 4.81 | 40.9 |

澱画分と上清画分とに分けた。上清画分には、
 硫安を30%飽和になるように加え、10000×gで
 10分間遠心分離して沈澱画分を得た。この105000
 ×g上清—30%硫安沈澱画分と105000×g沈澱画分
 の標品とについて、基質として、D-2-ヒドロキ
 シスルタル酸の代りに、コハク酸を用い、
 他は全く同じ条件の下に、コハク酸に対する
 脱水素酵素を調べたところ、105000×g沈澱画分
 では、コハク酸脱水素活性は、D-2-ヒドロキ
 シスルタル酸に対する脱水素活性の3.6~5.5倍
 の活性を示した。他方、105000×g上清—30%硫
 安沈澱画分では、D-2-ヒドロキシスルタル酸
 脱水素活性の方が、コハク酸脱水素活性より
 も11~20倍高い活性を示した。上記の知見よ
 り、酵素の部分精製には、105000×g上清画分を
 用いた。

次に、105000×g上清画分の硫安による分画を
 行ない、各画分について、D-2-ヒドロキシス
 ルタル酸脱水素活性を調べた結果を、表5に
 示す。酵素蛋白質は、比較的低濃度の硫安の

飽和度で沈殿す

ることかわかっ

た。この結果は

、この酵素が分

子量の大きな蛋

白質であるか、

あるいは、膜な

どから部分的に

遊離した成分(

筆者が用いた音

波破碎条件下で

は、クロマトフォ

アの膜の大半が切断されているものと推定さ

れる)などに結合しているのかのいずれかに

よるものと思われた。105,000×g上清画分には、

赤色の色素が共存しており、この色素の大部

分もまた硫安の30%飽和で沈殿する画分に認

められた。図4は、105,000×g上清の可視部の吸

収スペクトルである。590、550、513、484、415お

よび380nmにピークが認められ、415nmのピーク

表5 酵素蛋白質の硫安による分画

菌体約25gより得られた無細胞抽出液の、105,000×g上清画分に、各々の濃度の硫安を添加した後、100,000×gで10分間遠心分離し、各々の硫安飽和の沈殿画分を、0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)に溶かし、その一部を用いて活性を測定した。

| 画 分 | 総活性 (単位) | 分 布 (%) |
|----------------|-------------|------------|
| 硫安 0~20%飽和沈殿画分 | 0.53 | 6.6 |
| 硫安 20~25% " | 3.65 | 45.2 |
| 硫安 25~30% " | 2.97 | 30.6 |
| 硫安 30~33% " | 1.28 | 15.9 |
| 硫安 33~35% " | 0.13 | 1.6 |

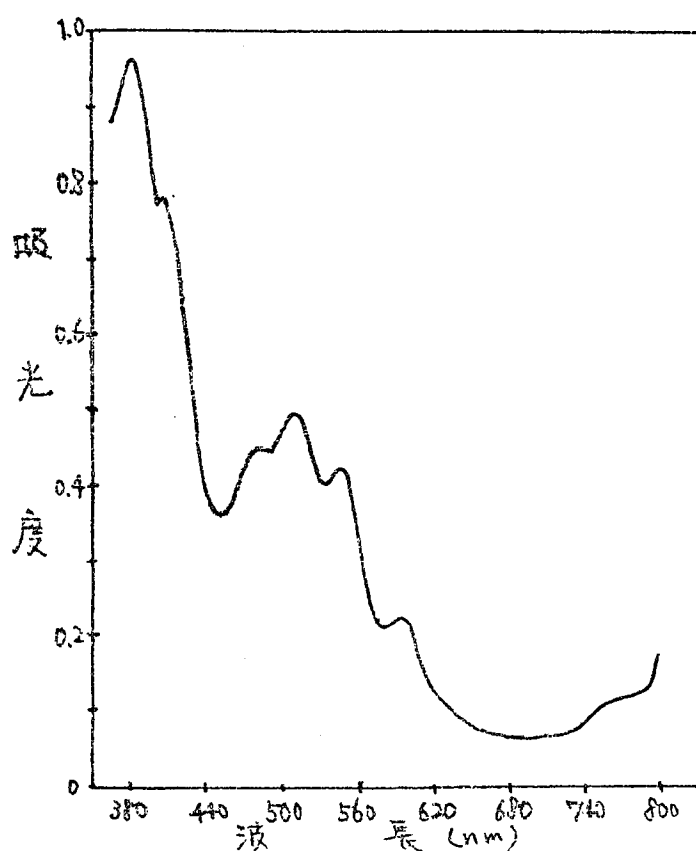


図4 105000×g上清画分 (0.8mg蛋白/ml) の可視部の吸収スペクトル

380 nmにおける吸光度が、1.0以下になるように0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)で希釈した試料を、日立24型分光光度計で吸光度を測定した。

を除けば、Kikuchi

とFrenkel (77) が得

た *R. rubrum* の色

素顆粒で、光

合成の場であ

るクロマトフ

アの吸収スペ

クトルと一致

する。後述す

る本酵素の電

子受容体に関

する実験結果

とも併せ考へ

て、この酵素

が、クロマト

フアなどから

音波破砕などの操作で遊離してきた成分と結

合している可能性が強く示唆された。

本酵素と色素とを分離するため、種々の界

面活性剤を用いた。硫酸 0-35% 飽和画分を、

0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶かし、種々の界面活性剤を最終濃度が 1% (ドデシル硫酸ナトリウムの場合は 0.5%) になるように加えた。15-20 分間攪拌した後、15% 飽和

表6 各種界面活性剤の処理による酵素の精製度の比較

| 界面活性剤 | 精製度 (倍) |
|--------------------|---------|
| コール酸ナトリウム (1%) | 1.6 |
| ドデシル硫酸ナトリウム (0.5%) | 0 |
| Triton X100 (1%) | 2.2 |
| Tween 80 (1%) | 1.4 |
| Tween 20 (1%) | 1.2 |

硫酸 0-35% 飽和液 5 滴 5 分間の酵素 (比活性 0.05 単位 / mg 蛋白) を 0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶かし、各界面活性剤を最終濃度が () 内の濃度になるように加え、15-20 分間攪拌後、15% 飽和になるように硫酸を加え、遠心分離した後、その上清の一部を用いて活性を測定、精製度を求めた。

になるように硫酸を加え、10000xg で 10 分間遠心分離し、その上清画分中の D-2-ヒドロキシアラルタル酸脱水素酵素活性を検討した。表 6 にその結果を示す。Triton X100 処理によって、酵素蛋白質は、コール酸ナトリウム処理によるよりもよく精製される。しかし、コール酸ナトリウム処理では、遠心分離した際、色素は

ほぼ完全に沈殿し、上清にはほとんどみられ
 なくなるのに対し、Triton X 100処理では、酵素
 蛋白質と色素とが充分分離しないなどの難点、
 が認められたので、以後、酵素精製にはコー
 ル酸ナトリウムを用いた。また、最終濃度 0.5
 %のコール酸ナトリウム処理でも、1%の場
 合と同様の結果が得られたので、使用濃度は
 0.5%とした。なお、実験に使用した程度の
 濃度では、コール酸ナトリウムは酵素活性に
 全く影響を与えなかった。前述したように、
 酵素蛋白質を含む上清画分と、色素を含む沈
 殿画分とに分離した後、この上清画分を105,000
 xgで1時間超遠心分離を行なったが、上清に
 酵素活性の95~97%が検出された。

コール酸ナトリウム処理後、硫酸による分
 画を行ない、どの硫酸飽和画分に、酵素蛋白
 質が沈殿するかを検討した。結果を表7に示
 す。硫酸の15~35%飽和画分に、酵素活性の
 約97%を回収した。2-2項で述べたように、こ
 のコール酸ナトリウム処理後の硫酸15-35%飽

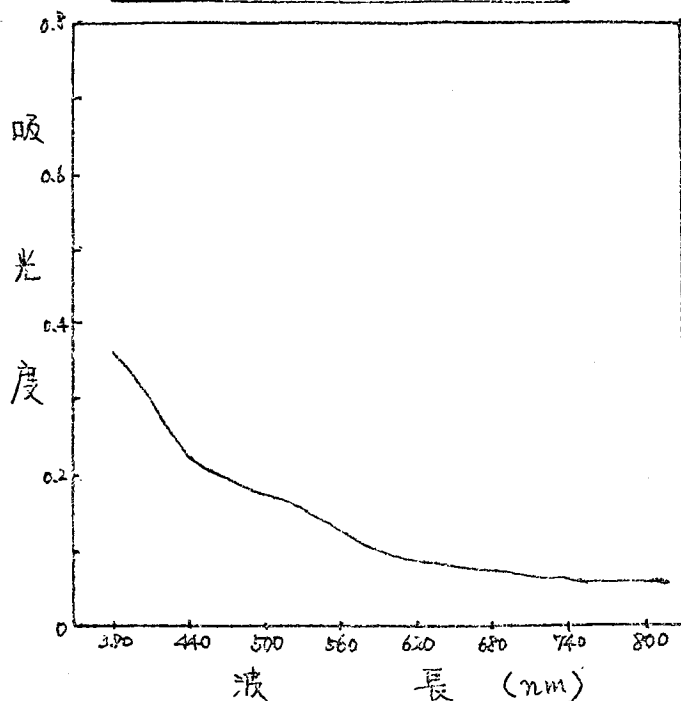
表 7 界面活性剤処理後の酵素蛋白質に対する硫酸による分解

| 硫酸画分 | 総活性 (単位) | 含有 (%) | 硫酸0-35%界面活性剤画分の酵素(比活性0.050単位/mg蛋白質)を1%コール酸ナトリウムで処理した後、各飽和度の硫酸で沈殿する試料を、各々0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)10mlに溶かし、その0.1mlをもって活性を測定した。 |
|---------------|-------------|-----------|---|
| 硫酸0-15%飽和沈殿画分 | 0.016 | 1.0 | |
| 15-20% " | 0.064 | 3.8 | |
| 20-25% " | 0.272 | 16.3 | |
| 25-30% " | 0.672 | 40.4 | |
| 30-35% " | 0.576 | 34.6 | |
| 硫酸35%飽和上清画分 | 0.032 | 1.9 | |

和沈殿画分を0.1Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)あるいは0.1Mトリステット酸緩衝液(pH 7.5)に溶かしたものを、部分精製酵素標品として、本酵素の諸性質の検討に用いた。

図5に、コール酸ナトリウム処理後、さらに、リン酸カルシウムゲルで処理した酵素標品(精製の概略は22項に示した)の可視部の吸収スペクトルを示す。図4に見られたピークは、全て消失し、酵素蛋白質と色素とを完全に分離していることが、明瞭に示された。

図5 部分精製酵素標品 (1.4mg蛋白/ml)
の可視部の吸収スペクトル



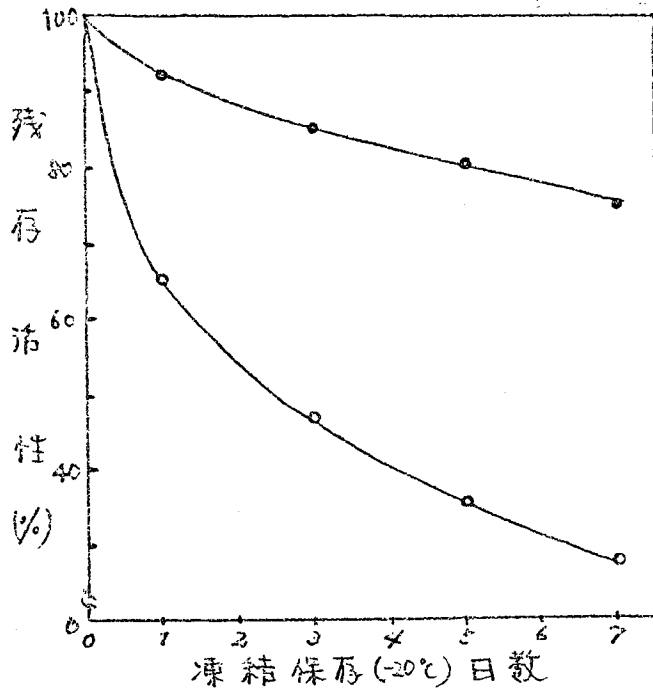
3-2 部分精製酵素の安定性

部分精製酵素標品について、凍結保存に対する活性の安定性を検討した。その結果を図6に示す。硫安0-33%飽和沈澱画分の酵素標品が、比較的安定であるのに対して、コール酸ナトリウム処理後の硫安15-35%飽和沈澱画分の酵素標品は失活しやすいことがわかった。次にコール酸処理後の酵素標品を用いて、酵素蛋白質の熱安定性を検討した。表8に示

図6 硫酸0.33%飽和沈殿画分のL-ヒスチジン
ナトリウム処理硫酸15.35%飽和沈殿画分の
活性に及ぼす凍結保存の影響

(48)

硫酸0.33%飽和沈殿画分(○—○), コーレスナトリウム処理硫酸
15.35%飽和沈殿画分(○—○)を0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液
(pH7.0)に溶かし凍結保存した。



した結果からわ
かるように、5
分間のインキュベ
ーションでは30°C
においては何と
んど失活は認め
られなかったが
、40°C、50°Cで
は、各々約40%
、5%にまで失
活することが認

められた。

また、この部分
精製酵素標品は、
透析に対しても不
安定であり、透析
により失活した酵
素は、5mMの2-メ
ルカプトエタノ
ールの添加後、1時

表8 酵素活性に及ぼす熱処理の影響

使用した基質濃度は、D-およびL-2-ヒドロキシグルタル酸、
各々、1mMおよび3.3mM。活性は10⁻³単位で表
示し、()内は5分間熱処理後の残存活性の
割合。コーレスナトリウム処理硫酸15.35%飽和
沈殿画分の酵素(比活性131×10⁻³単位/mg蛋白)180μgを
用いた。

| 基質 温度 | D-2-ヒドロキシ グルタル酸 | L-2-ヒドロキシ グルタル酸 |
|----------|--------------------|--------------------|
| 30°C | 23.5 (100) | 17.3 (100) |
| 40°C | 9.1 (38.5) | 8.2 (47.7) |
| 50°C | 1.6 (6.7) | 0.8 (4.6) |

間 0-4℃ に放置した後、0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に懸濁したセファデックス G-25 を充填したカラムを通して、2-メルカプトエタノールを除き、活性を測定した。活性の回復は認められなかった。

この酵素は、膜に結合している酵素を、トリフリンなどの蛋白質分解酵素や界面活性剤などで処理した際に、不安定になるのと同様、界面活性剤で処理することによって失活しやすくなることかわかった。しかし、この酵素活性の安定剤の探索については、十分な検討を行なわなかった。

3-3 酵素反応の化学量論性

2-ヒドロキシシクロタル酸の DCIP の還元と共役した酸化反応の反応生成物として、2-オキシシクロタル酸が推測されるので、2-オキシシクロタル酸の同定および定量を行なった。




2-オキシシクロタル酸の同定を行なうために、反応開始 10 分後に、2,4-ジニトロフェニルヒド

ラズン溶液 (2.5 μ mol DNP 試薬 / 1.2 N 塩酸) 1.5 ml を、反応混液 30 ml に加えて反応を停止させ、30°C に 60 分間放置して、2-オキソグルタル酸をヒドラゾン誘導体に変えた (78)。このヒドラゾン誘導体を酢酸エチルで抽出後、蒸留水で洗浄。0.1 M 炭酸水素ナトリウム溶液で抽出し、未反応の DNP 試薬および DCIP を除いた。2-オキソグルタル酸のヒドラゾン誘導体を含む炭酸水素ナトリウム溶液を、塩酸で酸性にした後、酢酸エチルで再抽出し、無水硫酸ナトリウムのカラムを通して脱水した。ヒドラゾン誘導体の酢酸エチル溶液を、減圧下に乾固し、予め 0.1 M 炭酸水素ナトリウム溶液で処理した濾紙につけ、ペーパークロマトグラフーにかけた。用いた溶媒系は (n-ブタノール : エタノール : 0.1 M 炭酸水素ナトリウム, 10 : 3 : 10, および、tert-ブチルアルコール : エタノール : 0.1 M 炭酸水素ナトリウム, 5 : 1 : 4) である。この二つの溶媒系において、ヒドラゾン誘導体は、対照として用いた既

知の2-オキシソフルタル酸のヒドラゾン誘導体
と同一のR_F値を示し、他のスポットは認めら
れなかった(図7)。

図7. 反応生成物のヒドラゾン誘導体のペーパークロマトグラム

試料1は、基質として、D-2-ヒドロキシソフルタル酸(1.0mM)を、試料2
は、L-2-ヒドロキシソフルタル酸(3.3mM)を用いた。標準試料は、2-
オキシソフルタル酸のヒドラゾン誘導体。用いた溶媒系は、n-ブタノール
: エタノール : 0.1M炭酸水素ナトリウム, 10 : 3 : 10である。

| | | |
|------|---|------|
| 標準試料 |  | 溶媒先端 |
| 試料1 |  | |
| 試料2 |  | |

反応の化学量論的關係を調べるために、反
応の時間的経過とともに、DCIPの還元量を測
定し、同時に、2-オキシソフルタル酸の生成量
をヒドラゾン誘導体として定量した。反応生
成物の同定の実験と同様、反応混液に、反応
開始1分、5分、10分および15分後に、ジニ
トロフェニルヒドラジン試薬を加え、反応生成
物を、ヒドラゾン誘導体に変えた。ヒドラゾ
ン誘導体は、酢酸エチル、0.1M炭酸水素ナト

リウム溶液で抽出後、炭酸水素ナトリウム溶液に、それと同量の2N水酸化ナトリウム溶液を加え、406nmにおける吸光度を測定し、分子吸光係数 $1.49 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

表9 酵素反応の化学量論性

ユール酸ナトリウム処理後の硫酸15-35%飽和沈殿画分(比活性 73.3×10^{-3} 単位/mg蛋白)を45μgを用いた。

| 反応時間 | 還元されたDCIP量 | 生成した2-オキソ ケルタル酸量 | 2-オキソケルタル酸量 / DCIP |
|-------|---------------------|---------------------|-----------------------|
| 1.0 分 | 3.3 ^{nmol} | 3.9 ^{nmol} | 1.18 |
| 5.0 | 16.9 | 17.1 | 1.01 |
| 10.0 | 30.8 | 36.8 | 1.19 |
| 15.0 | 48.6 | 54.1 | 1.11 |

を用いて、その量を決定した(79)。表9に示すように、DCIP 1モルが還元されると、2-オキソケルタル酸がおおよそ1モル生成し、反応が化学量論的に進行していることがわかった。

3.4 酵素反応の電子受容体

これまでの実験においては、酵素活性の測定に、合成酸化還元色素DCIPを電子受容体として用いたが、他の電子受容体がこの反応に有効であるか否かを検討した。

表10 種々の精製段階における酵素標品に
対する電子受容体としての活性

各電子受容体に対する活性の測定には、105000×g 上清を用いた時は 2mg, 硫酸 0-30% 沈殿画分を用いた時は 0.4mg の蛋白質を用い、ヨール酸ナトリウム処理画分を用いた実験では DCIP に対する活性については 0.2mg, 4+7ロム類に対する活性については、活性が低かったため、その倍量 0.4mg 蛋白質を用いた。

| 電子受容体 酵素標品 | 活性 (10 ³ 単位/mg 蛋白) | | |
|-------------------------------|-------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| | DCIP (0.1 mM) | 4+7ロム C (8.3 μM) | 4+7ロム C ₂ (8.3 μM) |
| 105,000×g 上清 | 6.8 | 1.5 | 2.3 |
| 硫酸 0-30% 沈殿画分 | 59.4 | 2.7 | 7.7 |
| ヨール酸ナトリウム処理 硫酸 15-35% 沈殿画分 | 96.0 | - | 1.7 |

酵素標品
として、105000
×g 上清を用
いた場合に
は DCIP の
他に 4+7
ロム C およ
び C₂ が、電
子受容体と
して有効で

あった。し
かし、自然界に存在する電子受容体である 4
+7ロム C および C₂ と共役した酵素活性は
表10に示すように、精製が進むにつれて急速
に失活した。表中には示さなかったが、NAD
、NADP に対しては、全く活性が認められなか
った。フェリシアニドに対する活性は、ほとん
ど見い出されなかった。以上の結果は、*R. rubrum*
で見い出された本酵素は、電子受容体の点か
ら、Beppu と Arima, Okuyama ら また、Lerud と

Whiteley が報告している NAD 依存性の 2-ヒドロキシフルタル酸脱水素酵素とは異っており、Reitz と Rodwell が *Pseudomonas putida* において見いだした酵素とよく類似している。

光合成細菌 *R. rubrum* において、チトクロム C_2 が、含色素顆粒クロマトフォアに含まれ、光合成反応に重要な電子伝達系を構成していることはよく知られている (80-81)。3-1項で述べたように、10500×g 上清の可視部のスペクトルがクロマトフォアのそれと酷似していること、界面活性剤処理などによって、赤色の色素が取り除かれるのにもなつて、種々のチトクロムに対する活性を失うことは、本酵素がクロマトフォアの電子伝達系と、何らかの関連をもっており、界面活性剤処理などによって、本酵素とチトクロム C_2 を結びつける役割を果たしていた電子伝達系の要素が、取り除かれたことに起因すると思われる。*Pseudomonas* において見いだされた D-2-ヒドロキシフルタル酸脱水素酵素は、*Pseudomonas* の電子伝達系と関連を

もち、直接の電子受容体はフラビンか非ヘム鉄であろうと考えられているが、*R. rubrum* において見いだした本酵素の直接の電子受容体が何かということは、今後の研究課題である。

3.5 基質特異性

序の項で触れたように、本酵素はコハク酸-グリシン回路を構成する一反応を触媒する酵素と考えられている。コハク酸-グリシン回路は、アミノアセトン回路と極めて類似した反応系から成り立っており、アミノアセトン回路におけるD-乳酸脱水素酵素に本酵素は対応する。上記のことから類推して、本酵素も、D-2-ヒドロキシフルタル酸に特異的な酵素であろうと考えた。しかし、1-2-2項で述べたように、現在までに、2-ヒドロキシフルタル酸の脱水素反応を触媒する酵素は、D型に特異的に働く酵素とともに、L型に特異的に働く酵素も知られており、本酵素の基質と

して、どちらの光学異性体が高い活性をもつかを検討した。その結果を表11に示す。

また、図8に、D型基質およびL型基質に対する基質飽和曲線を示す。実験を行なった限りの全ての濃度において、D型基質に対す

表11 種々の基質に対する部分精製酵素の脱木素活性

いずれの基質も、使用濃度は 1.7 mM である。コニル酸ナトリウム処理-硫酸 $15-35\%$ 飽和液液画分の酵素(比活性 59×10^3 単位/mg蛋白) $220 \mu\text{g}$ を使用した。

| 基 質 | 活 性 (10^3 単位) |
|----------------------------------|---------------------|
| D-2-ヒドロキシブチル酸 | 13.0 |
| L-2-ヒドロキシブチル酸 | 5.7 |
| D-リンゴ酸 | 0.06 |
| L-リンゴ酸 | 0.25 |
| L-リンゴ酸 + NAD(0.3 mM) | 0.80 |

る活性の才が、L型基質に対する活性より高かった。図9は、図8のデータをLineweaver-Burkの7°プロットにしたものである。この図より、D型基質に対する見かけ上のMichaelis定数(K_m)および最大速度(V_m)は、それぞれ $1.7 \times 10^{-4} \text{ M}$ および 0.056 単位/mg蛋白と求められ、L型基質に対する K_m および V_m は、それぞれ $1.3 \times 10^{-3} \text{ M}$ および 0.027 単位/mg蛋白と求められる。

図8 D-およびL-2-ヒドロキソクニタル酸の濃度に対する酵素活性の依存性
 コーレ酸ナトリウム及び塩-硫酸15-35%飽和沈澱画分の酵素(比活性 4.8×10^3 単位/mg蛋白)
 200 μ gを使用。●●● L-2-ヒドロキソクニタル酸, ○○○ D-2-ヒドロキソクニタル酸

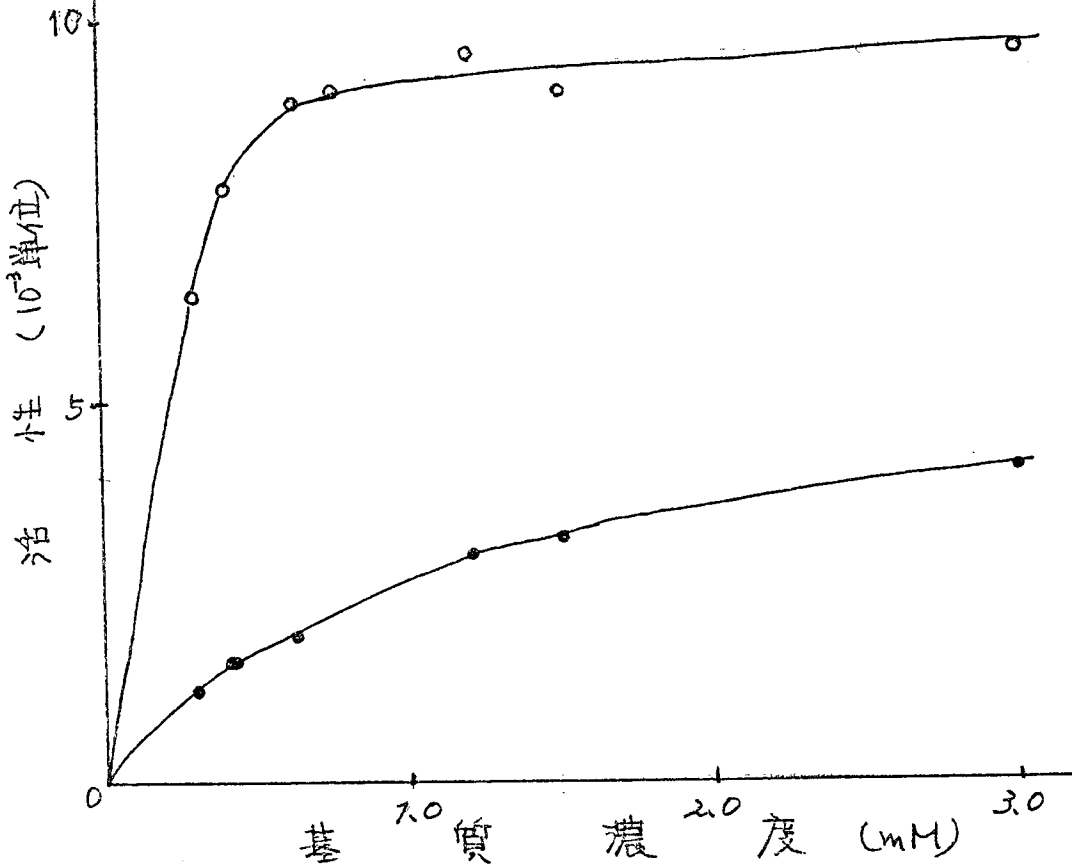
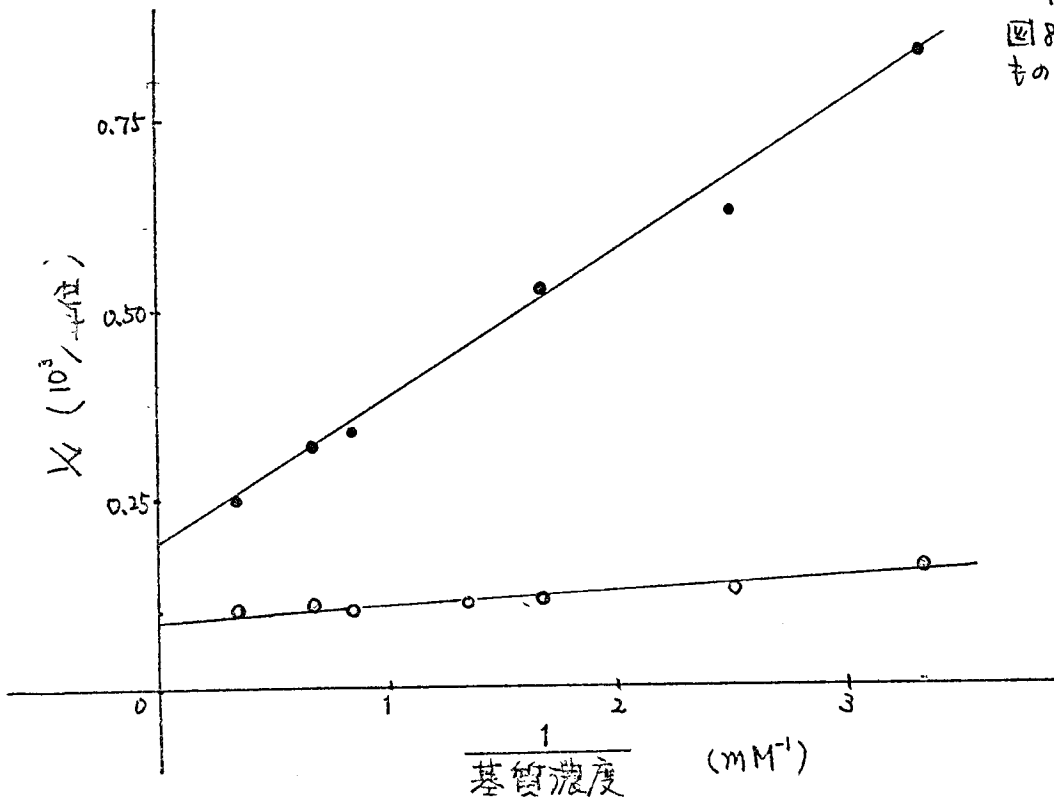


図9 Lineweaver-Burkプロット

図8のデータを逆数プロットした

もの ●●● L-2-ヒドロキソクニタル酸

○○○ D-2-ヒドロキソクニタル酸



L-リンドゴ酸に対する活性が、NADの添加によつて、高くなっていることから考へて、酵素標品中に、痕跡量のL-リンドゴ酸脱水素酵素の混在が考へられるが、L型基質に対する活性が、L-2-ヒドロキシグルタル酸にも作用しうるL-リンドゴ酸脱水素酵素の酵素標品への混入によるという可能性は、表11の結果から除外することができ。

上記の基質特異性に関する実験結果から、
 1) L型基質に対する活性が、D型基質がL型基質中に混入していることに基づくものであるのか、
 2) D型基質に働く酵素とは別に、L型基質に作用する酵素標品中に混入していることによるのか、
 3) 酵素標品中に、2-ヒドロキシグルタル酸異性化酵素が存在することによるのか否かの可能性が考へられる。

才2番目の別々の光学異性体に特異的な2つの酵素が共存している可能性については、以下に述べるいくつかの理由から、その可能性は小さいものと思われる。

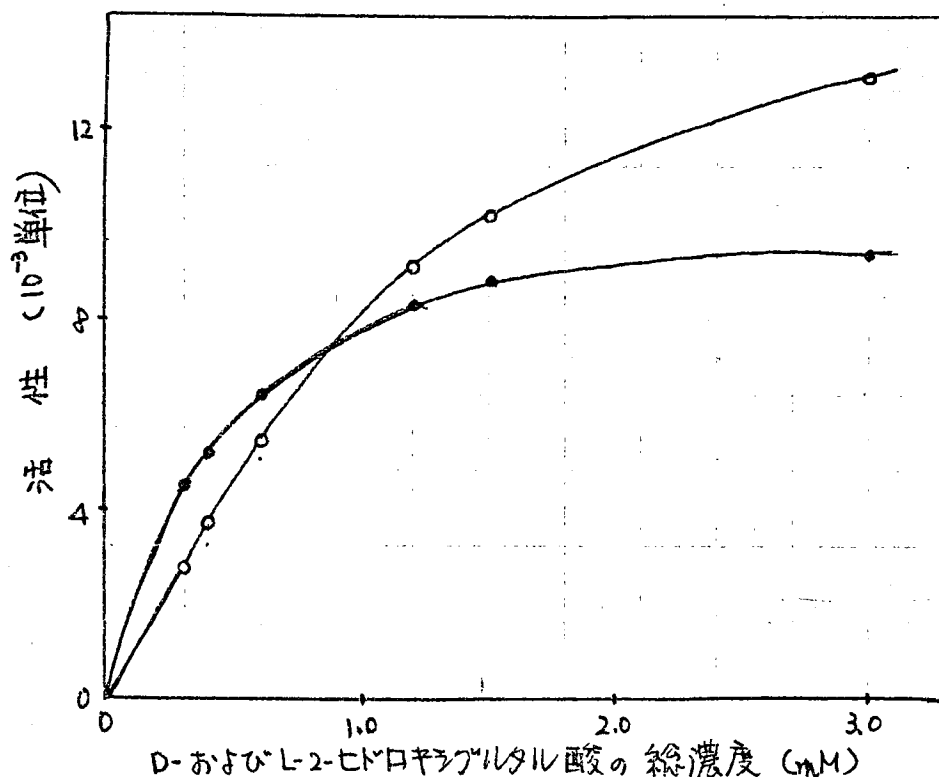


図10 D-およびL-2-ヒドロキシイソバチル酸を混合(%)=0.36
した基質に対する酵素活性の実測値と計算値の比較

(●-●) 実測値 (○-○) 計算値

コル酸ナトリウム処理-融点15-35
%飽和沈澱画分の酵素標品(比活性 48×10^3 単位/mg蛋白)200 μ g
を用いた。

D-およびL-2-ヒドロキシイソバチル酸の
それぞれに特異的な2つの酵素が共存
していると仮定し、基質中に含まれる
D-およびL型基質の濃度に対応する
酵素活性を加算したもの

1) D-およびL型基質それぞれに特異的な2種の酵素が混在していて、両者の間に相互作用がなく、かつ、他の光学異性体によって影響を受けない場合、見かけ上の活性は、電子受容体が充分量あれば、それぞれの基質に対する

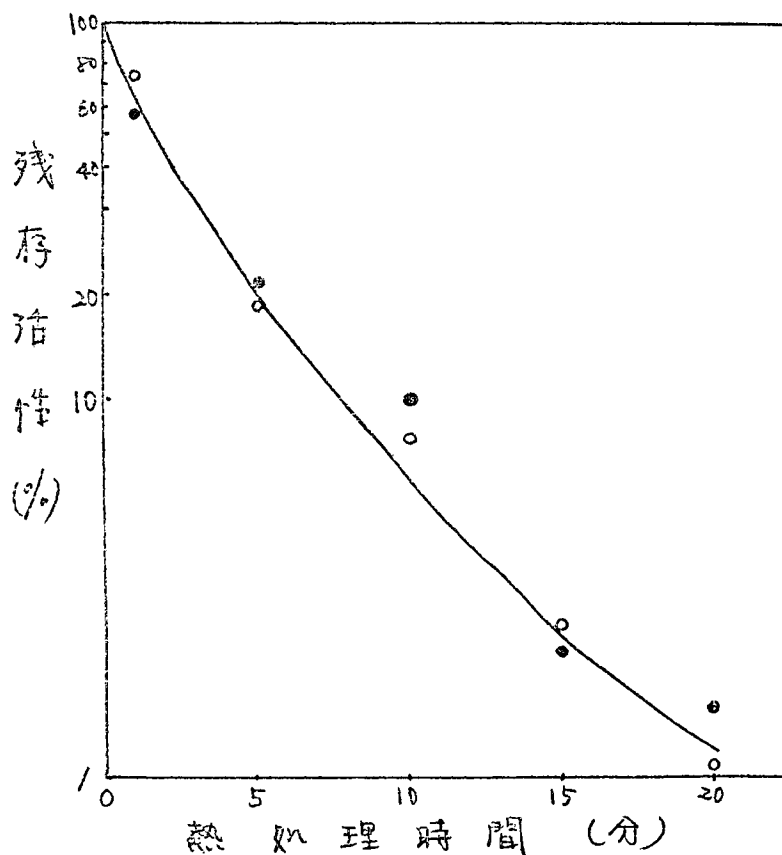
る活性の和になるはずである。しかし 図10
 に一例を示したか、理論的に求めた計算値と
 実測値とは一致しなかった。また D-および
 L型基質がある一定比で混合されている基質
 に対する V_m は、D-およびL型基質、それぞれ
 に対する V_m の和になるはずである。しかし、
 D型基質 / L型基質 = 0.36 の場合を考えてみ
 ると、D型基質に対する V_m が 0.056 単位/mg蛋白、
 L型基質に対する V_m が 0.027 単位/mg蛋白であるの
 に対し、混合した基質に対する V_m は 0.053 単位
 /mg蛋白と、実際には和とならない。

2) 図11に示すように、熱処理に対して、D型
 基質に対する活性も、L型基質に対する活性
 も、ほぼ平行して減少しており、両者の間に
 、有意の差は認められなかった。熱処理に際
 して、基質を添加した場合、どのような影響
 を与えるかを検討したか、ほぼ同様の失活の
 促進が認められ、両者の間には差は認められ
 なかった(図12)。D型基質に特異的な酵素
 と、L型基質に特異的な酵素の活性が平行

図11 D-およびL-2-ヒドロキシグルタル酸に対する活性に及ぼす

熱処理の影響 コーレ酸ナトリウム処理-殺菌法付脱和沈澱画分(比活性

81×10^3 単位/mg 蛋白)の溶液 (2mg 蛋白/0.1M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0))
を、43.5°C に、1、5、10、15 および 20 分間 インキュベートし、その一部をとり、D-2-ヒドロキシグルタル酸 (○-○) および L-2-ヒドロキシグルタル酸 (●-●) に対する活性を測定。基質濃度は、両基質とも、1.0mM である。



して失活する可能性は、比較的考え難く、以上の知見から、オエの可能性は少ないように思われる。

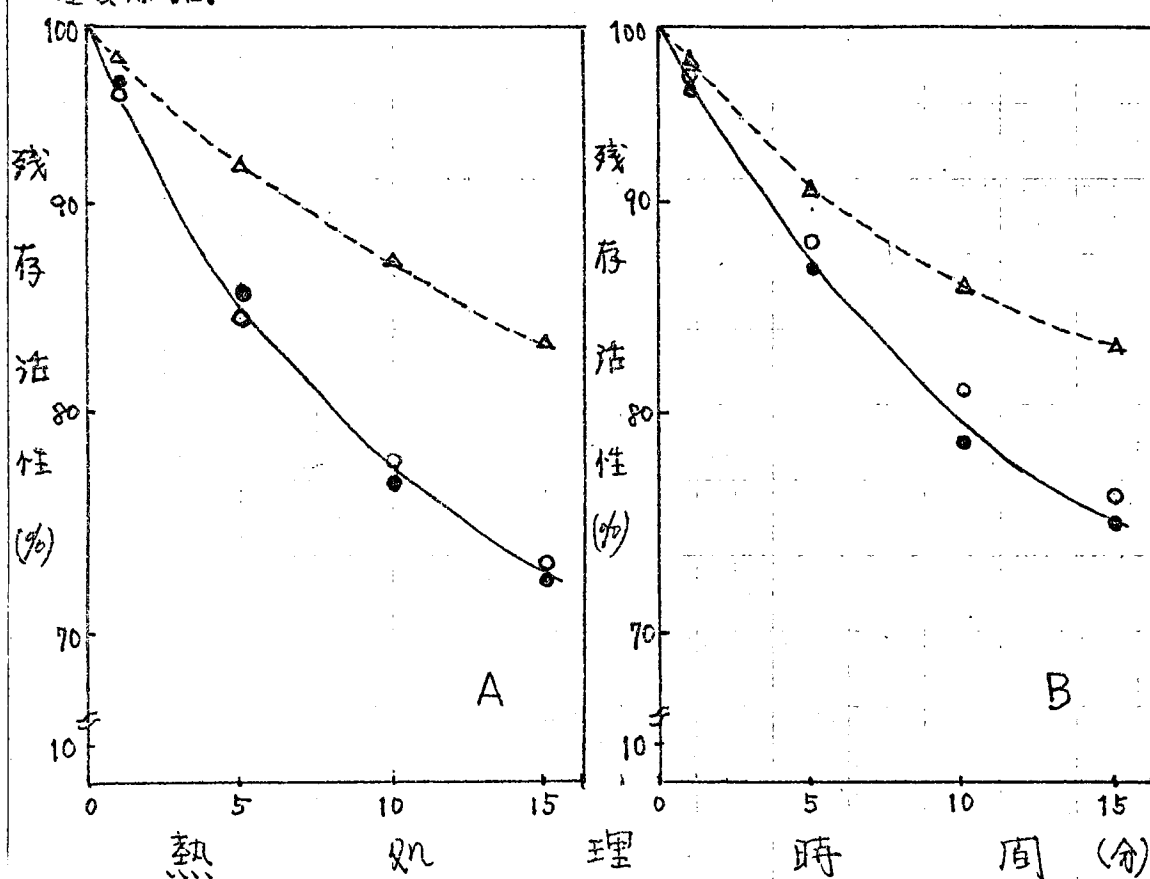
他の可能性として、2-ヒドロキシグルタル酸

図12 D-およびL-2-ヒドロキシアリタル酸に対する脱水素活性の熱失活に及ぼす、D-およびL-2-ヒドロキシアリタル酸の添加の影響

コイル酸ナトリウム及物理酵素(比活性 81×10^3 単位/mg蛋白)溶液(2mg蛋白/ml)に、D-あるいはL-2-ヒドロキシアリタル酸 1.3mM 添加後、35.0℃で、

1、5、10、15分間インキュベートし、その一部をとって D-2-ヒドロキシアリタル酸(0.87mM D型基質+0.13mM L型基質) [図A]、および L-2-ヒドロキシアリタル酸(0.87mM L型基質+0.13mM D型基質) [図B] を基質として活性を測定した。

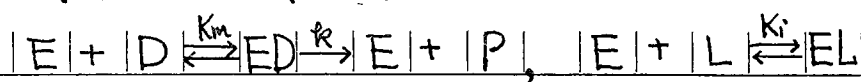
活性測定の際、最初に添加した基質が 酵素溶液とともに、反応混合液中に入ってくる量を考慮している。(Δ-Δ)無添加、(○-○)D型基質添加、(●-●)L型基質添加。



異性化酵素の混入の可能性も考えられる。しかし、L-2-ヒドロキシフルタル酸がまず、異性化酵素によって、D-2-ヒドロキシフルタル酸に異性化された後、脱水素酵素によって、DCIPの還元を伴って2-オキソフルタル酸に酸化されると仮定すると、L-2-ヒドロキシフルタル酸を添加した際、色素の還元でみる酵素活性には、一定の遅延が認められるはずである。しかし、実際には基質であるL-2-ヒドロキシフルタル酸の添加時から、600nmにおける色素の吸光度は直線的に減少し、遅延は認められない。したがって、異性化酵素とD-2-ヒドロキシフルタル酸脱水素酵素が、複合酵素を形成しているような場合を除いて、D-2-ヒドロキシフルタル酸脱水素酵素標品に、2-ヒドロキシフルタル酸異性化酵素が混入している可能性も、少ないものと思われる。

L-2-ヒドロキシフルタル酸に対する活性が、L型基質に混入しているD型基質によるという可能性は、「材料および方法」の項で述べた

ように、L型基質へのD型基質の混入量は約5%で、L型基質に対する活性を説明するには少な過ぎること。また、D型基質に対する V_m が、0.056単位/mg蛋白であるのに対し、L型基質に対する V_m が、0.027単位/mg蛋白と異なっているなどの知見から、一見除去されるかに見える。しかしながら、この酵素が、D-2-ヒドロキシシタルタル酸にしか働かず、もう一つの光学異性体、即ち、L-2-ヒドロキシシタルタル酸によって、拮抗的に阻害されると仮定すると、前述の知見や、図8の基質飽和曲線は、L型基質の中に混入しているD型基質によって、L-2-ヒドロキシシタルタル酸の見かけ上の酸化が観察されているのだと考えると、矛盾なく説明される。その際、純度100%のD-2-ヒドロキシシタルタル酸に対するMichaelis定数を K_m 、最大速度を V 。さらに、L-2-ヒドロキシシタルタル酸に対する阻害定数を K_i とすると、次のような関係式が成立する。



$$K_m = \frac{E \cdot D}{ED}, \quad K_i = \frac{E \cdot L}{EL} \quad v = k[ED]$$

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_m}{D} \left(1 + \frac{L}{K_i}\right)}$$

$$\frac{V}{v} = 1 + \frac{K_m}{a \cdot S} \left\{ 1 + \frac{(1-a)S}{K_i} \right\}$$

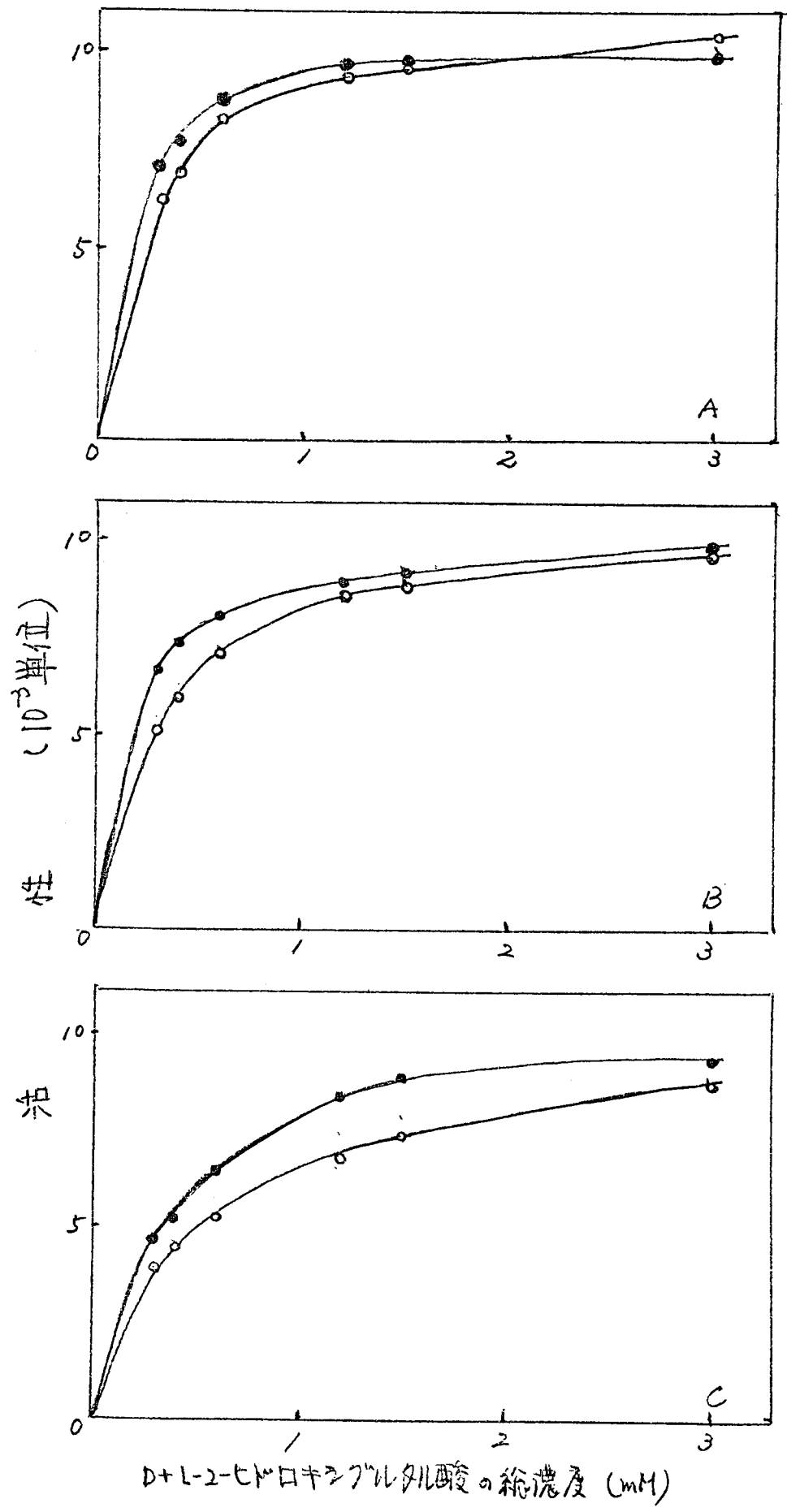
ここで、 S は実験に使用した基質の濃度、 a は基質中の D 型基質の割合である。上式から、図 9 から求めた Michaelis 定数、最大速度 $app K_m$, $app V_m$ と、 K_m , V , K_i 値との関係は、次式で表わされる。

$$app K_m = \frac{K_m K_i}{K_m(1-a) + K_i a}, \quad app V_m = \frac{V K_i a}{K_m(1-a) + K_i a}$$

この式によって K_m , V および K_i 値を求めると K_m は $1.5 \times 10^{-4} M$, K_i は $2.0 \times 10^{-3} M$ と求められる。 V の値は、D 型基質を用いた実験から得た値と L 型基質を用いた実験から得た値が、ほぼ一致した値 0.060 単位/mg 蛋白となり、この仮定の妥当性を示唆している。また、両基質の混合比を、いろいろに変え、実験値と上記の仮定

図13 D-およびL-2-ヒドロキシグルタル酸を種々の比で混合した基質に対する酵素活性の実測値と計算値の比較

コ-ル酸ナトリウム阻理-硫酸アンモニウム/鉍和液酸混合の酵素(比活性 48×10^3 単位/mg 蛋白) 200 μ g を実験に用いた。(○) 実測値 (●) 計算値 (Lineweaver-Burk のプロットより求めた純度 100% の D-2-ヒドロキシグルタル酸に対する Michaelis 定数 K_m , 最大速度 V 純度 100% の L-2-ヒドロキシグルタル酸に対する阻害定数 K_i (詳細は本誌参照) を用い、式 $V = \frac{V}{1 + K_m/(1 + 4/K_i)}$ に代入して求めた。
D-2-ヒドロキシグルタル酸 $K_m = 2.2$ (A), 0.91 (B), 0.36 (C)
L-2-ヒドロキシグルタル酸 $K_i = 2.2$ (A), 0.91 (B), 0.36 (C)



に基づいて計算で求めた値と、比較した結果を図13に示した。実測値と計算値は、完全には一致しなかったが、この可能性を否定する結果はえられなかった。

上記の考察から、L-2-ヒドロキシグルタル酸に対する活性を説明するために、いくつかの可能性が考えられるが、それらの中で、L-2-ヒドロキシグルタル酸へのD型基質の混入に基づく可能性が、最も大きく、他の可能性は小さいように思われる。

表11には示さなかったが、本酵素は、D,L-乳酸、グリコール酸およびコハク酸には作用しない。また、D-およびL-リンゴ酸に対する活性も、ほとんど無視できるほど小さい。したがって、本酵素は、乳酸、コハク酸およびリンゴ酸に働く脱水素酵素とは異っている。本酵素は、D-2-ヒドロキシグルタル酸に特異的に作用し、L-2-ヒドロキシグルタル酸には働かず、むしろ、L-2-ヒドロキシグルタル酸によって拮抗阻害をうけると考えられる。

3-6 酵素反応の pH依存性

この酵素反
応の pH 依存性
について検討
した結果を図
14 に示す。酸
化還元色素で
ある DCIP の吸
光度は、pH 値
によって少し
変化するの
で、各 pH にお
ける酵素活性は

各々の pH に
おける DCIP の
酸化型に対す
る還元型の差

分子吸光係数を用いて、計算することによっ
て求めた値である。0.1 M リン酸カリウム緩衝

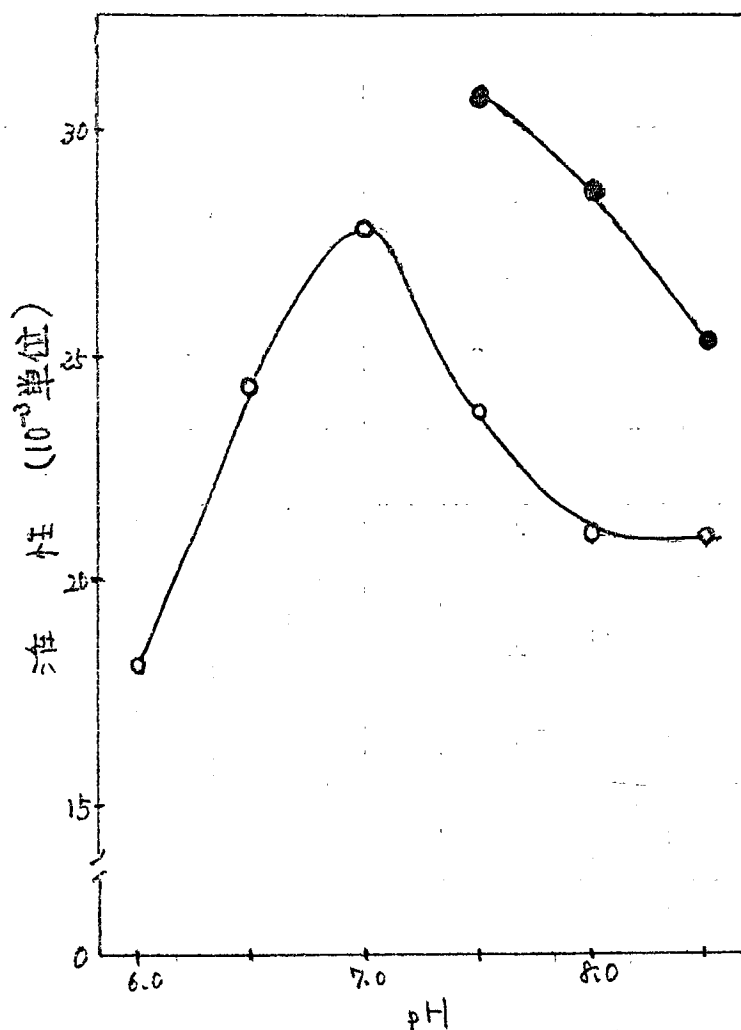


図14 D-2-ヒドロキシイソバチル酸脱水素酵素活
性に対する pH の影響

コイル酸ナトリウム処理後の酵素標品 (比活性 0.132
単位/mg 蛋白) 230 μ g を用いて、0.1 M リン酸カリウム緩
衝液 (○-○), 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (●-●) における
活性を測定

液においても、また、0.1M トリス-塩酸緩衝液においても、D-2-ヒドロキシフルタル酸脱水素酵素活性は、7.0 付近に至適 pH をもつと思われる。トリス-塩酸緩衝液における活性のオカ、リン酸カリウム緩衝液における活性よりも、検討した限りでは、いずれも少し高かった。pH 9.0 では、色素の還元は見られず、反応は進行しないように思われた。

3.7 阻害剤

基質の構造類似物である D-および L-リンゴ酸が、D-および L-2-ヒドロキシフルタル酸の脱水素反応にどのような影響を与えるかを検討した。その結果を表 12 に示す。

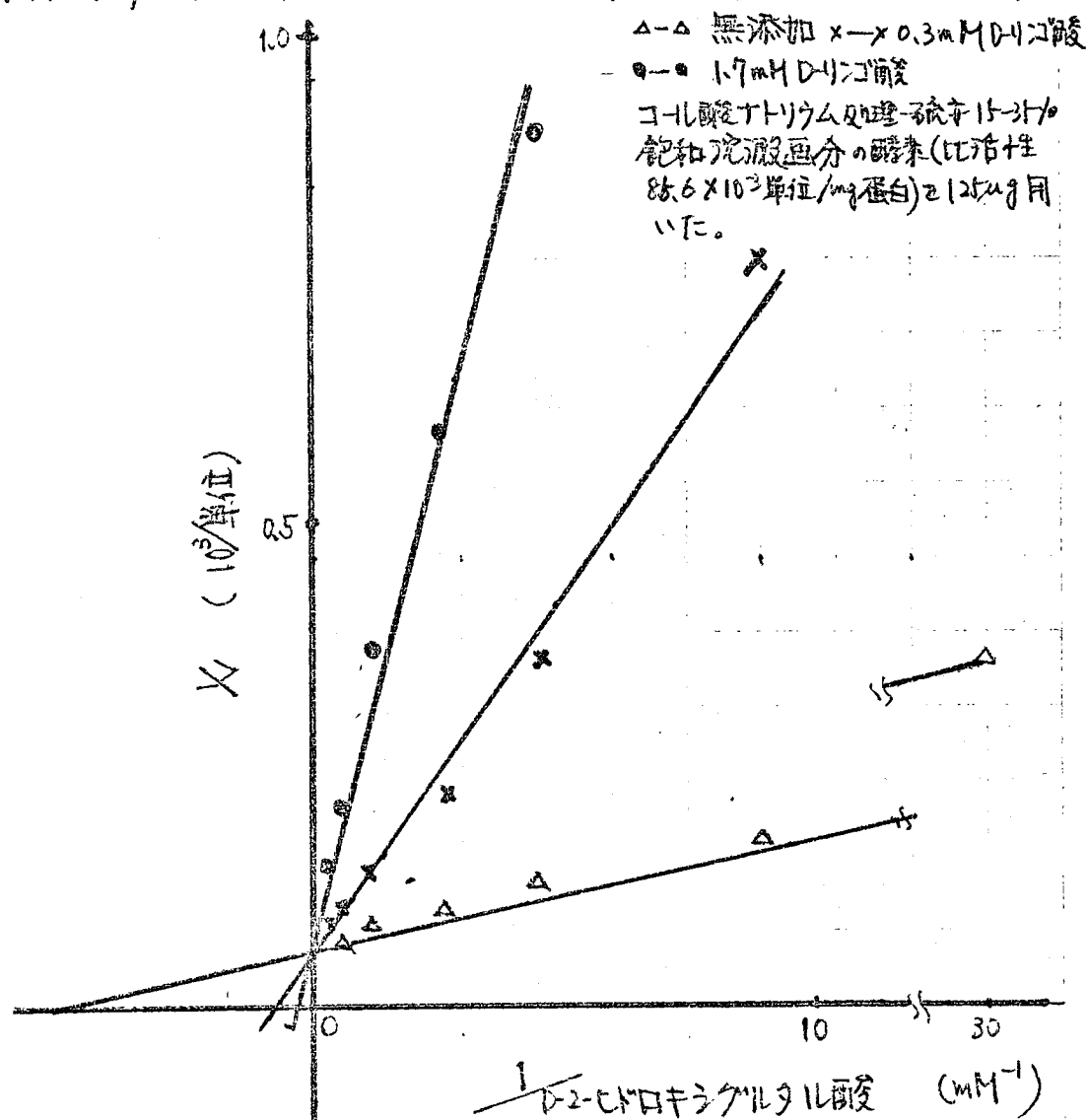
表 12 D-および L-リンゴ酸の D-および L-2-ヒドロキシフルタル酸の脱水素反応に対する影響

コール酸ナトリウム処理後の融点は 35% 飽和沈澱画分の酵素 (比活性 5.8×10^3 単位/mg 蛋白) 220 μ g を用いた。基質として用いた D-および L-2-ヒドロキシフルタル酸の濃度は、それぞれ 1.0 mM および 3.3 mM である。

| 基 質 | 活 性 (15 単位) | | |
|----------------|-------------|------------------|------------------|
| | 無添加 | 添 加 | |
| | | D-リンゴ酸 3.3 mM | L-リンゴ酸 3.3 mM |
| D-2-ヒドロキシフルタル酸 | 12.8 | 4.0 | 11.1 |
| L-2-ヒドロキシフルタル酸 | 8.3 | 1.3 | 4.0 |

た。3.3mMのD-リンゴ酸はD型基質に対する活性を69%阻害し、L型基質に対する活性を84%阻害した。他方、L-リンゴ酸はD型基質に対する活性に対してはほとんど阻害せず、L型基質に対する活性を、およそ50%阻害した。D-リンゴ酸によるD-2-ヒドロキシアラロン酸脱水素活性への影響

図5. D-リンゴ酸のD-2-ヒドロキシアラロン酸脱水素活性への影響



タル酸の脱水素活性に対する阻害は、拮抗的
 で(図15 参照)、その阻害定数 K_i は、 $1.0 \times 10^{-4} M$ で
 あった。D-リシニンゴ酸のL型基質に対する阻害
 は、Lineweaver-Burkのフロットが折れ曲ることか
 ら、単純な拮抗阻害とは考えられなかった。
 したがって、阻害実験の現在までに得られた
 知見から、この酵素標品の基質特異性といく
 つの酵素が含まれているのか、の問題につい
 て、はっきりした解答は見い出せなかった。

次に、コハク酸-グリシン回路と類似した
 酵素系であるアミノアセトン回路において、
 本酵素と類似したD-2-ヒドロキシ酸の脱水素
 反応を触媒するD-乳酸脱水素酵素の阻害剤と
 して報告されている蔞酸(82)が、本酵素活性に
 どのような影響を与えるかを検討した。その
 結果を表13に示した。蔞酸は、D型基質に対
 する活性については93%阻害し、L型基質
 に対する活性については84%阻害した。蔞酸
 濃度を、 $1.67mM$ 、 $3.33mM$ と変え、蔞酸を添加した
 場合、および、添加しなかった場合のD+2+ヒ

ドロキシグルタル酸

に対する基質飽和曲

線を、図16に示す。

Lineweaver-Burk のプロット

トを行なった結果、

蔞酸による D-2-ヒド

ロキシグルタル酸脱

水素酵素に対する阻害は、単純な拮抗阻害と

は考えられなかつた。

D-乳酸脱水素酵素の場合は、セファデックス G

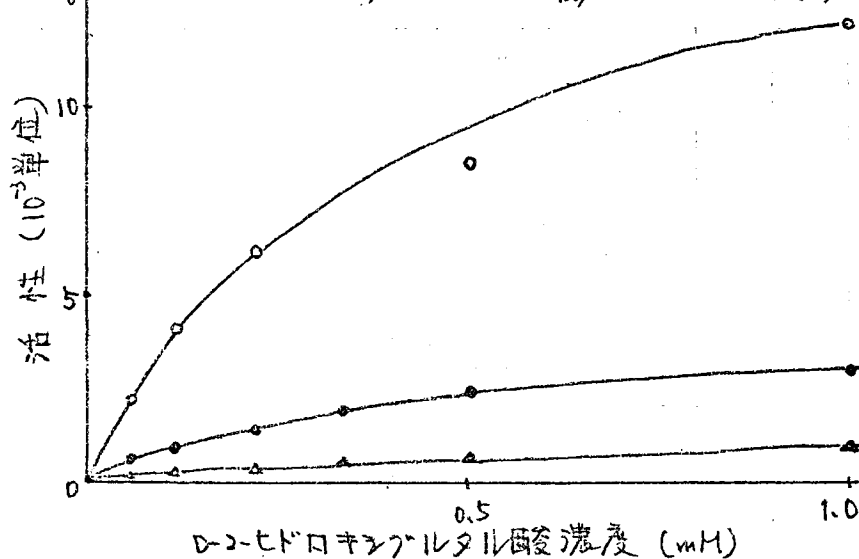
表13 蔞酸の D-および L-2-ヒドロキシグルタル酸脱水素酵素活性に対する影響

リン酸カルシウムゲル処理した酵素(比活性 96.8×10^3 単位/mg 蛋白) 125 μ g を用いた。

| 基 質 (1.0 mM) | 活 性(10 単位) | |
|-----------------|------------|-----------|
| | 対 照 | 3.3 mM 蔞酸 |
| D-2-ヒドロキシグルタル酸 | 12.1 | 0.85 |
| L-2-ヒドロキシグルタル酸 | 5.7 | 0.92 |

図16 D-2-ヒドロキシグルタル酸脱水素活性に対する蔞酸

の影響。リン酸カルシウムゲル処理した酵素(比活性 96.8×10^3 単位/mg 蛋白) 125 μ g を用いた。○-○ 無添加, ●-● 1.67 mM 蔞酸, △-△ 3.33 mM 蔞酸,



25のカラムを通すだけで失活し、蔞酸の他に、エチレンジアミン四酢酸（以下、EDTAと略記する）、0-フェナンスロリンでも阻害を受け、亜鉛イオンを添加することによって、活性が回復することなどの知見から、金属酵素であると考えられている。しかし、D-2-ヒドロキシフルタル酸脱水素酵素の場合は、表14にその結果を示すように、EDTAや0-フェナンスロリンによっては阻害されない。また、蔞酸による阻害は、亜鉛など金属イオンを、D-乳酸脱水素酵素で活性の回復が認められた 1.0×10^{-4} M程度添加しても、全く軽減されなかった。

表15に、本酵素活性に対する、2価金属イオンの添加効果を検討した結果を示す。 1.0×10^{-4} Mの比較的

表14 キレート作用をもつ各種化合物のD-2-ヒドロキシフルタル酸脱水素酵素に対する影響

コイル酸ナトリウム処理-硫酸1-3%飽和度酸基の酵素（比活性 97.4×10^3 単位/mg蛋白）63μgを用いた

| | 活 性 | |
|---------------|-----------|-------|
| | 10^3 単位 | % |
| 無 添 加 | 6.14 | 100.0 |
| EDTA (3.3 mM) | 6.16 | 100.3 |
| 0-フェナンスロリン(〃) | 6.11 | 99.4 |
| 蔞 酸 (〃) | 2.34 | 38.8 |

表15 D-2-ヒドロキシグルタル酸脱水素活性に及ぼす2価金属イオンの影響 (74)

コイル酸ナトリウム処理-滅菌15-35%
飽和濃度の酵素(比活性97.4
 $\times 10^{-3}$ 単位/mg蛋白)を、0.1Mトリス-
塩酸緩衝液(pH7.5)に懸濁し、
その一部(63 μ g)を反応混液に加
え、同時に2価金属塩の水溶液を
10 μ l加えて攪拌した。5分間放
置後、基質を添加攪拌して、活
性を測定した。各金属塩の最終
濃度は、 1.0×10^{-5} Mである。

| 2価金属塩 | 活 性 | |
|----------|-----------|------|
| | 10^3 単位 | % |
| 無 添 加 | 6.14 | 100 |
| 塩化亜鉛 | 4.90 | 79.8 |
| 塩化マグネシウム | 4.90 | 79.8 |
| 塩化コバルト | 4.01 | 65.3 |
| 塩化マンガン | 2.48 | 40.3 |
| 塩化カルシウム | 4.71 | 76.7 |
| 塩化バリウム | 5.47 | 89.1 |

低濃度の2価金属イオンの添加によって、酵
素活性は活性化されることはなく、むしろ
阻害された。塩化オニ銅、硫酸オニ鉄溶液に
ついては検討したが、反応速度を求めること
ができなかった。

上記の結果は、D-2-ヒドロキシグルタル酸
脱水素酵素は、D-乳酸脱水素酵素のような金
属酵素とは考え難いことを示している。蔞酸
のD-2-ヒドロキシグルタル酸脱水素酵素に対
する阻害作用は、蔞酸が、酵素活性の発現に

必要な金属イオンとキレートして阻害するとい
うよりは、むしろ、基質の類縁物として作用
していることを意味しているものと思われる
。また、マロン酸も本酵素活性を阻害し、そ
の阻害は、同時に蔞酸を添加した場合、蔞酸
による阻害との和になった。

本酵素のその他の性質

筆者は、リンゴ酸培地で、光嫌気条件下に
生長させた光合成細菌 *R. rubrum* の無細胞抽出液
中に、D-2-ヒドロキシグルタル酸脱水素酵素
を見い出した。Reitz と Rodwell は、*Pseudomonas putida*
において、本酵素活性を見い出し、この酵素
が、リジンの分解代謝に関与する誘導酵素で
あると報告している。筆者は、リジン培地で
、光嫌気条件下に *R. rubrum* を生長させ、10500×g
上清画分における本酵素活性を測定した。そ
の結果を、表16に示す。本酵素活性は、リジ
ン培地で生長させた菌体の10500×g上清画分
においても、その存在が認められたが、リンゴ

酸培地で生長させた菌体の105000×g上清画分に認められた活性と

表16 リンゴ酸およびリジン培地に生長させた菌体の105000×g上清画分におけるD-2-ヒドロキシグルタル酸脱水素活性の比較

| 培地 | 比活性 (10^3 単位/mg蛋白) |
|----------------|--------------------------|
| 0.6% DL-リンゴ酸培地 | 6.9 |
| 0.3% L-リジン培地 | 6.4 |

ほぼ同程度の値を示した。本酵素活性は、光嫌気条件下に、酢酸培地で生長させた菌体の無細胞抽出液においても、その存在が認められた。上記の結果は、*R. rubrum*においては、本酵素は、リジンの分解代謝に関与する誘導酵素というよりは、むしろ、構成酵素ではないかと推察される。本酵素の生理的役割は、今日までのところ不明確であるが、1-14項に記したように、2-ヒドロキシグルタル酸を経由するグルタミン酸の代謝経路が Ohmori らの研究(7)から、*R. rubrum*においても存在すると考えられるので、本酵素は、*R. rubrum*におけるグルタミン酸生合成経路に関与しているのでは

ないかと推定される。コハク酸-グリシン回路の生体内における役割が明らかにされるにつれて、本酵素の生理的役割も明確になり、また逆に、本酵素の生理的役割が明らかにされるにつれて、コハク酸-グリシン回路の生理的役割も、明確になるものと期待される。

4 考 察

電子受容体の要求性および基質特異性の点から、1-2項で述べた2-ヒドロキシ酸脱水素酵素は、いくつかの型に類別することかできる。特に、基質特異性の点から考えると、次の2グループに分類される。オ1のグループは、比較的広い基質特異性をもつ酵素で、異なった長さの炭素鎖をもつ2-ヒドロキシ酸に作用する酵素で構成される。動物組織で見い出されたD-2-ヒドロキシ酸脱水素酵素が、その典型例で、 $C_3 \sim C_8$ のD-2-ヒドロキシ酸に作用すると報告されている。このグループに属する酵素であっても、D型基質か、L型基質かのいずれか一オの光学異性体にしか作用しない。もう一つのグループは、ただ一つの基質にしか働かない、厳格な基質特異性をもつ酵素で構成されるグループであり、本報文で記述したD-2-ヒドロキシスルタル酸脱水素酵素は、このグループに属すると思われる。1-2-ヒドロキシスルタル酸に対する見かけ上の活性

は、L型基質の中に混入しているD型基質によるものと思われ、本酵素は、D-2-ヒドロキシシフルタル酸に、特異的に作用するものと考えられる。したがって、現在までに、動物、*Rhodopseudomonas spheroides*, *Achromobactor* sp. および、*Micrococcus aerogenes* において、見い出されたL-2-ヒドロキシシフルタル酸脱水素酵素とは、明らかに異っている。L-2-ヒドロキシシフルタル酸脱水素酵素のうち、*Achromobactor*, および、*Micrococcus* において見い出された酵素は、電子受容体として、NADを要求する。本酵素は、NADを電子受容体とせず、粗酵素液の段階では4-トクロムCが有効であった。この点においても、本酵素は上記の酵素と異っている。

D-2-ヒドロキシシフルタル酸に作用する酵素は、これまで *Pseudomonas putida* において見い出されているのみである。ReitzとRodwell (71) は、この酵素が、天然の電子受容体として、フラビンが、非ヘム鉄と共役し、*Pseudomonas* の電子伝達系と関連をもつ酵素であろうと報告して

いる。また、彼らは、この酵素が、リジンやその代謝物によって誘導される、リジンの分解代謝経路の反応を触媒する誘導酵素である、と考えている。しかしながら、光合成細菌 *R. rubrum* において見出した D-2-ヒドロキシグルタル酸脱水素酵素は、38項で述べたように、リジンを唯一の炭素源として培養した菌体の、無細胞抽出液の $105000 \times g$ 上清画分における活性が、リンゴ酸を唯一の炭素源として用いた場合の $105000 \times g$ 上清画分の活性と、同程度の活性であることなどから、リジンの分解代謝に関与する誘導酵素であるとは、考え難い。

筆者と同じ研究室の Shigesada (26) は先に、 C^{14} -5-アミノレブリン酸の放射活性が、コハク酸-クリシン回路を経由して、クルタミン酸に取り込まれること、および、D-2-ヒドロキシグルタル酸脱水素酵素が、この回路を構成する一反応を触媒することを示した。本酵素が、D-型基質に特異的であることは、コハク酸-クリシン回路と、アミノアセトン回路の類似

性から考えて、もっともなことのようと思われる。アミノアセトン回路における、D-乳酸脱水素酵素が、NADを電子受容体とせず、チトクロム類を電子受容体とするのと同様に、NADが、本酵素の電子受容体となりえず、チトクロムC類が電子受容体として有効であるという知見も、興味深い点である。しかし、その生理的な役割の解明は、今後に残された課題である。特に、本酵素の直接の電子受容体の解明、および、電子伝達系における本酵素の生理的役割の解明は、1-2項で述べた光合成細菌における酸化還元反応と有機酸代謝の関連を究明する上からも重要なものと思われる。

最近、LerudとWhiteley (35) および JohnsonとWestlake (34) は、*Micrococcus aerogenes* や *Accidaminococcus* sp. のようなグルタミン酸発酵を行なう細菌を、グルタミン酸培地で生長し、その無細胞抽出液を用いて、グルタミン酸が2-ヒドロキシグルタル酸に変換することを実証した。さ

らに、Ohmori ら(37)は、グルタミン酸培地で生
 長させた *R. rubrum* の無細胞抽出液を用いて、グ
 ルタミン酸が、グルタミン酸発酵系の中間代
 謝物であるメチルアスパラギン酸やメサコン
 酸以外に、2-ヒドロキシグルタル酸に変換さ
 れることを報告している。上記に引用した報
 文に、2-ヒドロキシグルタル酸の光学活性に
 ついての知見がないのは残念であるが、2-ヒ
 ドロキシグルタル酸が、種々の細菌において
 、グルタミン酸代謝に密接に関連しているこ
 とを、示唆するものであると思われる。現在
 までのところ、その生理的役割が不明なコハ
 ク酸-グリリン回路が、グルタミン酸生合成
 に果たす役割、および、5-アミノレブリン酸の
 競争を通して、ホルズリン生合成系に果たす
 役割などの解明については、今後の課題であ
 る。また、D-および L-2-ヒドロキシグルタル
 酸脱水素酵素の、それぞれにもつ生理的役割
 についても、その解明は今後に残されている
 。

謝 辞

本研究は、香月裕彦教授の指導のもとで、
筆者が、京都大学大学院理学研究科の大学院
在学中に行なったものである。本研究を行な
うにあたって、終始適切な助言を頂き、また
懇切丁寧に論文を見ていただいた香月教授に
心から感謝の意を表します。また、共同研究
者として、研究室の先輩として、千葉大学医
学部、京都大学ウイルス研究所へ就職されて後
も、いろいろと指導・助言をいただきました
重定勝哉博士に、深く感謝しますとともに、
常に快よく貴重な時間をさいて討論に応いて
いただいた徳重助教授をはじめ、生物化学研
究室の各位に、厚くお礼申しあげます。

また、*R. rubrum* の菌株を分けていただき、千
トワロム C₂ をいただきました大阪大学蛋白質
研究所、堀尾武一博士に感謝いたします。

参考文献

1. A. J. Kluyver and C. B. Van Niel (1956) "Microbe's Contribution to Biology"
日本語訳「生物学の発展と微生物」佐藤 了、丹羽充訳、岩波書店
2. C. T. Gray and H. Gest (1965) *Science*, **148**, 186-192
3. R. L. Anderson and E. J. Ordal (1961) *J. Bacteriol.*, **81**, 139-146
4. L. H. Strockland (1935) *Biochem. J.*, **29**, 288-290
5. R. T. Okinaka and W. I. Dobrogosz (1967) *J. Bacteriol.*, **93**, 1644-1650
6. R. G. Hausen and U. Henning (1966) *Biochim. Biophys. Acta*, **122**, 355-358
7. G. Cohen-Bazire, W. R. Sistrom and R. Y. Stanier (1956) *J. Cell. Comp. Physiol.*, **49**, 5-68
8. M. A. Eisenberg (1953) *J. Biol. Chem.*, **203**, 815-836
9. M. A. Shaw and W. R. Richards (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 863-870
10. 菊地吾郎 (1965) 蛋白質・核酸・酵素, 才10巻, 1458-1466
11. H. Gest (1963) "Bacterial Photosynthesis" (H. Gest, A. S. Pietro and L. P. Vernon eds) Antio. Press, chap 'Metabolic Aspects of Bacterial Photosynthesis' p. 129-150
12. C. G. Kannangara (1969) *Plant. Physiol.*, **44**, 1533-1537
13. I. Kouko and E. Conn (1961) *J. Biol. Chem.*, **236**, 2692-2698
14. Y. Kurashima, N. Hayashi and G. Kikuchi (1970) *J. Biochem.*, **67**, 863-865
15. M. Higuchi, T. Ohba, H. Sakai, Y. Kurashima and G. Kikuchi (1968) *ibid.*, **64**, 795-805
16. 重定勝哉 (1965) 京大 理化学 昭和40年度 修士論文
17. A. Kawaguchi, M. Morishita, K. Shigesada and H. Katsuki (1968)
Mem. Fac. Sci. Kyoto Univ., **23**, 1-10

18. S.R. Elsdon and J.G. Ormerod (1956) *Biochem. J.*, 63, 691-701
19. C. Catnelli, G. Ehrensward, J. Reid, E. Salusta and R. Stjernhorn (1951)
Arkiv. Kemi., 3, 315-322
20. C.R. Benedict and R.W. Rennie (1964) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 14, 474-481
21. D.S. Hoare (1963) *Biochem. J.*, 87, 284-301
22. G. Kikuchi, A. Kumar, P. Talmage and D. Shemin (1958) *J. Biol. Chem.*, 233, 1214-1219
23. K. Shigesada, K. Hidaka, H. Katsuki and S. Tanaka (1966) *Biochim. Biophys. Acta*, 112, 182-185
24. B.B. Buchanan and M.C.W. Evans (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 54, 1212-1218
25. B.B. Buchanan, M.C.W. Evans and D.I. Arnon (1967) *Arch. Microbiol.*, 59, 32-40
26. K. Shigesada (1972) *J. Biochem.*, 71, 961-972
27. D. Shemin and C.S. Russell (1953) *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 4873-4874
28. A. Neuburger and J.I. Scott (1953) *Nature*, 172, 1093-1094
29. D. Shemin, C.S. Russell and T. Abramsky (1955) *J. Biol. Chem.*, 215, 613-626
30. D. Mazzei and S. Grunick (1956) *ibid.*, 219, 435-446
31. K. Shigesada, T. Ebisuno and H. Katsuki (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,
39, 135-141
32. L. Anderson and R.C. Fuller (1967) *Plant. Physiol.*, 42, 487-490
33. A. Neuburger and J.M. Turner (1963) *Biochim. Biophys. Acta*, 67, 342-345
34. W.M. Johnson and D.W.S. Westlake (1971) *Can. J. Biochem.*, 49, 1103-1107
35. R.F. Verud and H.R. Whiteley (1971) *J. Bacteriol.*, 126, 571-577

36. H.A. Barker (1961) "The Bacteria" (J.C. Gunsalus and R.Y. Stanier eds)
Vol. III, chap 3, Academic Press, N.Y. p.151-207
37. H. Ohnori, H. Ishitani, K. Sato, S. Shimizu and S. Fukui (1971)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 43, 156-162
38. J. Porter and M.J. Merrett (1970) *FEBS Letters*, 7, 271-273
39. H.L. Kornberg, P.J.R. Phizackerley and J.R. Sadler (1960) *Biochem. J.*, 77, 428-445
40. H.L. Kornberg and J. Vasselles (1960) *J. Gen. Microbiol.*, 23, 511-517
41. I. Olsen and J.M. Merrick (1968) *J. Bacteriol.*, 95, 1774-1778
42. H. Nakano, K. Sasaki, Y. Kurokawa and H. Katsuki (1971) *J. Biochem.*, 70, 429-440
43. H.C. Reeves, W.J. Stahl and S.J. Aji (1963) *J. Bacteriol.*, 86, 1352-1353
44. J. Payne and J.G. Morris (1969) *FEBS Letters*, 4, 52-54
45. C.W. Shuster and M. Doudoroff (1962) *J. Biol. Chem.*, 237, 603-607
46. M.W. Nirenberg and W.B. Jacoby (1960) *ibid.*, 235, 954-960
47. H. Katsuki, K. Takeo, K. Kamada and S. Tanaka (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27, 331-336
48. J.J. Marr and M.M. Weber (1971) *ibid.*, 45, 1019-1024
49. J.R. Stern and C.S. Hegre (1966) *Nature*, 212, 161-162
50. D.J. Hopper, P.J. Chapman and S. Dagley (1970) *J. Bacteriol.*, 134, 1197-1202
51. I. Zelitch and S. Ochoa (1953) *J. Biol. Chem.*, 201, 707-718
52. G.A. Codd, J.M. Lord and M.J. Merrett (1969) *FEBS Letters*, 5, 341-342
53. G.W. Schwert and A.D. Winer (1963) *The Enzymes*, 7, 127-148

54. N.O. Kaplan (1965) "Evolving Genes and Proteins" (V. Bryson and H. J. Vogel eds) Symp. Rutgers State Univ. chap 'Evolving of Dehydrogenases' p.243-277
55. A. Meister (1950) *J. Biol. Chem.*, 184, 117-129
56. R. Stambaugh and D. Post (1966) *ibid.*, 241, 1462-1467
57. C.A. Appleby and R.K. Morton (1959) *Biochem. J.*, 73, 539-550
58. E. Boeri and L. Tosi (1956) *Arch. Biochem. Biophys.*, 60, 463-475
59. E.M. Tarmy and N.O. Kaplan (1968) *J. Biol. Chem.*, 243, 2587-2596
60. R.C. Garland and N.O. Kaplan (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 26, 279-285
61. T.P. Singer, E.B. Kearney, E. Boeri and M. Rippa (1960) *ibid.*, 4, 428-434
62. T. Cremona and T.P. Singer (1964) *J. Biol. Chem.*, 239, 1466-1473
63. F. Labeyrie, P.F. Slonimski and L. Naslin (1959) *Biochim. Biophys. Acta*, 34, 262-265
64. E. Kun (1963) *The Enzymes*, 7, 149-160
65. R.O. Moore and C.A. Villze (1962) *Science*, 138, 508-509
66. P.K. Tubbs and G.D. Greville (1961) *Biochem. J.*, 81, 104-114
67. H. Weil-Malherbe (1937) *ibid.*, 31, 2084-2094
68. M. Rothstein and L.L. Miller (1954) *J. Biol. Chem.*, 206, 243-253
69. T. Beppu and K. Arima (1966) *J. Biochem.*, 48, 557-568
70. M. Okuyama, S. Tsutuki and G. Kikuchi (1965) *Biochim. Biophys. Acta*, 110, 66-80
71. M.S. Reitz and V.W. Rodwell (1969) *J. Bacteriol.*, 120, 708-714
72. 小山一 (1968) 京大理化学 昭和43年度卒業論文

73. J. G. Ormerod, K. S. Ormerod and H. Gest (1961)
Arch. Biochem. Biophys., 94, 449-463
74. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951)
J. Biol. Chem., 193, 265-275
75. E. Fisher and A. Moneschi (1912) *Chem. Berichte*, 45, 2447-2453
76. T. Murai, A. Kawaguchi, H. Nakano and H. Katsuki (1971) *Agr. Biol. Chem.*, 35, 242-247
77. T. Kihara and A. W. Frenkel (1963) "Bacterial Photosynthesis"
(H. Gest, A. S. Pietro and L. P. Vernon eds) Antro Press p. 115
78. H. Katsuki, T. Yoshida, C. Tanegashima and S. Tanaka (1968) *Anal. Biochem.*, 24, 112-119
79. C. Kawano, H. Katsuki, T. Yoshida and S. Tanaka (1962) *ibid*, 3, 361-368
80. T. Horio and M. D. Kamen (1961) *Biochim. Biophys. Acta*, 48, 266-286
81. T. Horio, M. D. Kamen and H. Klerit (1961) *J. Biol. Chem.*, 236, 2783-2787
82. T. Cremona (1964) *ibid*, 239, 1457-1465